

## (12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2006年7月27日 (27.07.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/078072 A1

## (51) 国際特許分類:

CI2N 5/10 (2006.01)	CI2N 15/16 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)	CI2N 15/62 (2006.01)
CI2P 21/02 (2006.01)	CI2N 15/67 (2006.01)
CI2N 15/13 (2006.01)	

原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内  
Gunma (JP). 富塚 一磨 (TOMIZUKA, Kazuma) [JP/JP];  
〒3701295 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP).

## (21) 国際出願番号:

PCT/JP2006/301379

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

## (22) 国際出願日:

2006年1月23日 (23.01.2006)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

## (25) 国際出願の言語:

日本語

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY,

## (26) 国際公開の言語:

日本語

/ 続葉有]

## (30) 優先権データ:

特願2005-014826 2005年1月21日 (21.01.2005) JP

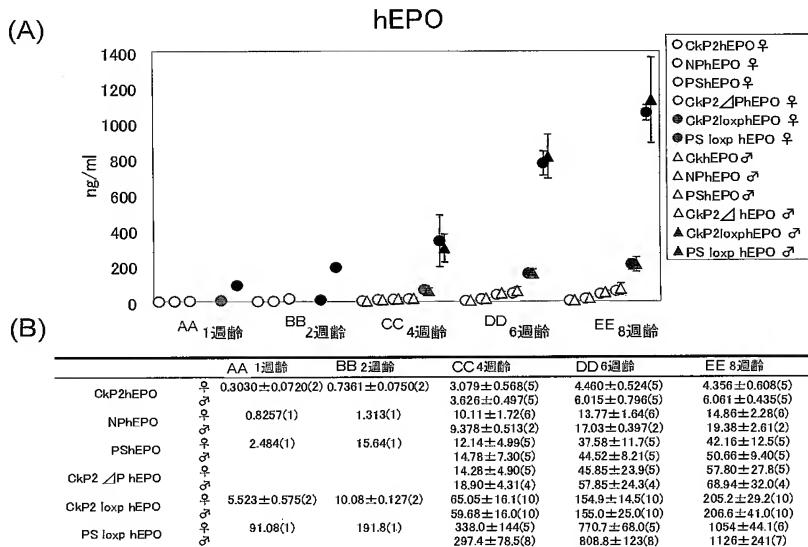
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1048288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo (JP).

## (72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 柿谷 誠 (KAKITANI, Makoto) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮

## (54) Title: NON-HUMAN CHIMERIC ANIMAL AND USE THEREOF

## (54) 発明の名称: キメラ非ヒト動物およびその使用



AA... 1-WEEK-OLD

BB... 2-WEEK-OLD

CC... 4-WEEK-OLD

DD... 6-WEEK-OLD

EE... 8-WEEK-OLD

(57) Abstract: A cell having pluripotency originated from a non-human animal, which has therein foreign DNA encoding a desired protein in such a manner that the expression of the protein is regulated by the regulatory region of a gene which can be expressed in a particular cell and/or tissue, the cell being characterized in that a nucleic acid fragment containing a promoter/the entire of part of the 5'-untranslated region/a region encoding a leader sequence originated from the gene is ligated to the foreign DNA and that one or more drug resistance marker genes used for the introduction of the foreign DNA into the genome are removed; a non-human

/ 続葉有]

WO 2006/078072 A1



KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

---

chimeric animal which is produced using the cell and which is capable of highly expressing a desired protein or a progeny animal of the chimeric animal; a process for producing a desired protein using the animal; and a method for analyzing the biological functions of a gene using the animal.

(57) 要約: この発明は、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の制御領域によって所望の蛋白質の発現が制御されるべく該所望の蛋白質をコードする外来DNAを含む、非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞であって、該特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子由来のプロモーター／5'非翻訳領域の一部もしくは全部／リーダー配列コード領域を含む核酸断片が該外来DNAに結合されていること、および該外来DNAのゲノムへの導入のために使用された1もしくは複数の薬剤耐性マーカー遺伝子が除去されていること、を特徴とする細胞、この細胞を用いて作製されたかつ所望の蛋白質を高発現するキメラ非ヒト動物またはその子孫、ならびにこれらの動物を用いて所望蛋白質を製造する方法および遺伝子の生体内機能を解析する方法を提供する。

## 明 紹 書

## キメラ非ヒト動物およびその使用

## 技術分野

本発明は、外来 DNA の発現能が増強されたキメラ非ヒト動物及びその子孫、並びにその使用に関する。具体的には、そのようなキメラ非ヒト動物及びその子孫を用いて、所望の蛋白質または該蛋白質をコードする遺伝子の機能を解析する方法、および/または有用物質を生産する方法に関する。

## 背景技術

ヒトゲノム全塩基配列決定という歴史的な研究成果 (International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, 409:860-921, 2001) は、同時に膨大な数の新規遺伝子の機能解明という新たな研究課題をもたらした。例えば 24 本のヒト染色体中 2 番目に小さく、最初に全塩基配列が決定されたヒト 22 番染色体 (Dunham ら、*Nature*, 402:489-495, 1999) を例にとれば、合計 545 個の遺伝子（偽遺伝子を除く）の存在が推定された。その内訳は、塩基配列およびアミノ酸配列が既知の遺伝子が 247 個、既知遺伝子と相同性を示す新規遺伝子が 150 個、Expressed Sequence Tag (EST) データベースに登録されている機能未知の配列と相同な新規遺伝子が 148 個であった。加えてゲノム配列から遺伝子を直接予測するソフトウェア (GENSCAN) による解析では、さらに 325 個の転写産物未確認の新規遺伝子が予測された (Dunham ら、前記)。遺伝子とその産物である蛋白質の生体内における機能を明らかにすることは、生命活動のプログラムを理解する上で重要なばかりでなく、様々なヒト疾患を克服するための新たな医薬品の開発につながる可能性がある。すなわち、新規遺伝子の効率的な機能解析のための技術開発は、ポストゲノム時代の生命科学、医学研究における大きな課題である。

胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) は、胚盤胞の内部細胞塊より樹立される未分化な株化細胞を言い、生殖細胞を含む様々な体組織に分化する能力を保持する。例えばマウスの場合、ES 細胞をマウス初期胚 (宿主胚) に注入する

ことにより体組織の細胞が ES 細胞由来、及び宿主胚由来の細胞の混合物からなるキメラマウスが誕生する。特に ES 細胞由来の生殖細胞を保持し、ES 細胞の遺伝情報を子孫に伝達できるキメラマウスをジャームラインキメラと呼ぶ。ジャームラインキメラ同士あるいはジャームラインキメラと適当なマウス系統を交配することにより ES 細胞由来の遺伝情報を保持する F1 マウスが生まれる。このことを利用して、あらかじめ ES 細胞において特定の遺伝子を改変もしくは挿入しておくと、任意のノックアウト (KO) マウス、トランスジェニック (Tg) マウスおよびノックイン (KI) マウスを作製することができる。これまでに多くの研究者によって多数の KO マウスが作製されてきたが、その解析結果は基礎生物学から臨床医学に至る広範な分野に重要な情報をもたらしてきただけでなく、多数のヒト疾患モデル動物を提供してきた。KO マウスは今日においても遺伝子の生体内機能解明のために最も広く用いられている手法である。一方、特定の外来 DNA が特定の遺伝子内に相同組換え (Le Mouellic ら、2002 年、日本国特許 3298842 号) あるいはランダム挿入 (Gossler ら、Science, 244: 463-465, 1989) により挿入されたマウスを一般的に KI マウスと呼ぶが、さらに特定のプロモーター、外来 DNA、ポリ A 付加部位からなる発現ユニットを特定の染色体領域に挿入することにより作製されるマウスは多数の遺伝子の生体内機能解明に適している (富塚ら、2003 年、W003/041495) という報告もある。

しかしながら Tg マウス、KI マウスおよび KO マウスは共に 1 つの遺伝子を扱うだけでも多大な時間と労力を必要とする。相同組換えの効率は、通常ランダム挿入クローン 1 万個から 100 個に 1 個程度とされている。ランダム挿入体に対する相同組換え体の比率を向上させるために、これまで様々な検討がなされてきた。例えばベクターに含まれる相同領域ゲノム DNA の長さが長いほど好ましいこと (Deng & Capecchi, Mol. Cell. Biol., 12:3365-71, 1992)、あるいはターゲティングを行うマウス ES 細胞の系統と同じマウス系統のゲノム DNA (アイソジエニック DNA) を用いることが好ましいことなどが報告された (Deng & Capecchi、前記)。さらに現在最も広く用いられている方法は、上記選択マーカーに加えて、相同領域ゲノム DNA の外側にネガティブ選択マーカーを含む KO ベクターを用いることである。この方法は、ランダム挿入体においては有毒なネガティブマーカーが

発現して細胞が死ぬが、相同組換え体ではそれが起こらないという現象を利用してい。ネガティブ選択マーカーとしては Mansour らにより報告 (Nature, 336:348-352, 1988) された HSV-tk 遺伝子（培地中にガンシクロビル、FIAU などのチミジンアナログを入れる必要がある）、または Yagi ら (Anal. Biochem., 214:77-86, 1993) により報告された DT-A (ジフテリア毒素A鎖) などが知られている。このネガティブ選択法が理論通りに機能した場合、全てのコロニーが相同組換え体という結果が予想されるが、実際には報告により大きなばらつきがあり、その濃縮効果は一般的に数倍程度とされている。

変異型 ES 細胞からのマウス作製だけでなく、相同組換えにより遺伝子改変、破壊が施された哺乳動物細胞株は、それ自体が該遺伝子の機能を解明する上で重要な材料となる。さらに、相同組換えは遺伝子欠損や変異に起因する疾患（遺伝性疾患）の究極的な治療法と考えられてきた。しかし、哺乳動物細胞株または初代培養細胞における相同組換え体とランダム挿入体の比率は、マウス ES における比率と同等か、さらに低いものであり、細胞レベルの遺伝子機能解析や遺伝子治療での応用は、上記比率の改善が望まれていた (Yanez & Poter, Gene Therapy, 5:149-159, 1998)。

ヒトゲノム全塩基配列が決定した現在、望まれるのは、多数の新規遺伝子について網羅的な生体内機能解析を行うことができるようなシステムである。そのためには導入遺伝子を高レベルで発現する動物個体を確実、容易、かつ多種類同時に作製できることが必要である。ヒトゲノム情報がもたらす新規遺伝子のうち、サイトカイン、増殖因子、ホルモンなどと相同性を持つ分泌性の蛋白質をコードするものは、そのものが医薬品となり得る点で非常に興味深い研究対象といえる。すなわち、分泌性蛋白質をコードする遺伝子とその産物の生体内機能解析のための新たな効率的手法の開発は、ヒト疾患治療のための医薬品開発を大きく進展させることができると想像される。

## 発明の開示

本発明は、特定の染色体領域における相同組換え効率が向上した、かつ導入された DNA によってコードされる蛋白質の発現量が向上した、胚性幹 (ES) 細胞を

提供することを目的とする。

本発明はまた、遺伝子改変された ES 細胞を用いて所望の蛋白質を発現する遺伝子組換え非ヒト動物を作製することを目的とする。

本発明はさらに、遺伝子組換え非ヒト動物およびその子孫を用いて対象遺伝子の機能を解析するため、および/または有用物質を生産するための簡便かつ再現性の高い方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、特定の染色体領域、すなわち RS エレメント領域に薬剤耐性マーカー遺伝子発現ユニットが挿入された ES 細胞を用いることで、RS エレメント領域より約 25kb 上流の免疫グロブリン遺伝子 C $\kappa$  エクソン領域を含む遺伝子ターゲティングベクターのランダム挿入体に対する相同組換え体の比率が大きく改善されることを見出した。染色体上の特定の領域にあらかじめ施された改変が同領域の配列を含まないターゲティングベクターを利用した遺伝子ターゲティングにおける相同組換え効率に影響を与えることは今までに知られておらず、驚くべきことであった。

本発明者らはさらに、遺伝子改変された ES 細胞を B 細胞欠損宿主胚に注入することによりキメラマウスを作製することに成功し、この方法により作製されたキメラ動物において、毛色のキメラ率に関わらず、導入された構造遺伝子由来の産物の過剰発現効果を観察した。このシステムの利用により、従来法と比較して効率良くかつ確実に導入遺伝子を高発現するキメラ動物を得ることができることが確認された。

このように、本発明者らは、所望の蛋白質を発現するキメラ非ヒト動物の作製方法、ならびに所望の蛋白質を発現するキメラ非ヒト動物またはその子孫、あるいは該動物由来の細胞、組織またはハイブリドーマに関して、所望の蛋白質の発現量を従来と比較してさらに飛躍的に高める方法を見出した。

本出願人によって出願された PCT 国際出願 WO 00/10383 号パンフレット（2000 年 3 月 2 日国際公開）に記載された発明の目的の一つである、分泌性機能未知遺伝子の生体内における機能同定を考慮した場合、キメラ非ヒト動物における発現量（血清中濃度）を更に向上させることによって、該遺伝子の機能同定の効率が高まると考えられる。例えば機能未知遺伝子を発現させた非ヒト動物において何

ら変化が認められなかつた場合には、該遺伝子の B 細胞からの分泌量が十分でないために、該遺伝子のターゲットとなる組織周辺で作用に必要な臨界濃度に達していない可能性を考えなければならない。こうしたケースの場合、より高いレベルの発現が可能となれば、臨界濃度を超える該遺伝子産物が供給され、表現型が観察される可能性がある。また医療用を含む有用蛋白質を動物の体液中に生産するために、様々なトランスジェニック動物が作製されてきたが、十分な発現量を達成するためには多数のトランスジェニック個体を得た上で選抜する必要があり、導入遺伝子が高発現する個体を得ることは容易ではなかつた。それゆえ、本発明による高レベルの外来 DNA 発現を可能にするシステムは産業上利用価値が高い。

本発明者らは、本出願人によって出願された PCT 国際出願 (WO 03/041495 号パンフレット (2000 年 3 月 2 日国際公開)) に記載されたキメラ非ヒト動物における導入遺伝子の発現量 (血清中濃度) のさらなる向上を目的として鋭意努力を重ねた結果、既に開示された方法よりさらに発現量を高める方法を見出した。本発明には上記目的を達成するための、以下 A、B の 2 種の異なる方法が含まれる。A は、導入遺伝子発現カセットに含まれる、プロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域を含む遺伝子断片に関する、また、B は、導入遺伝子近傍に存在する薬剤耐性遺伝子マーカーを除去することに関する。さらに驚くべきことに、A、B の方法を同時に実施することによる相乗的な効果により、従来の Tg マウス作製法と比較して非常に高いレベルの外来 DNA 発現が可能であることを示した。

以下に方法 A、B の概要について記載する。

A:導入遺伝子発現カセットに含まれるプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域を含む遺伝子断片について WO 03/041495 号パンフレットに開示された方法と比較し以下の変更を加えた。

(1) Ig<sub>κ</sub> プロモーターについて上記開示と同じ Ig<sub>κ</sub> 可変領域に由来するプロモーターに加えて、異なる Ig<sub>κ</sub> 可変領域に由来するプロモーターも用いて比較を行つた。

(2) Ig<sub>κ</sub> プロモーターについて上記開示 (約 300 塩基対) より上流側に長いゲノム断片 (約 450 塩基対) を用いた。

(3) (1)、(2) に示したプロモーターから転写開始点、イントロンを経てリーダー配列コード領域に至る配列を、マウス免疫グロブリン  $\kappa$  遺伝子ゲノムより取得して用いた。

(4) 上記開示においては導入遺伝子本来のリーダー配列コード領域を使用していたが、本発明では (3) に示した断片に含まれる Ig  $\kappa$  可変領域のリーダー配列コード領域と、本来のリーダー配列コード領域部分を除去した導入遺伝子と人為的に結合して用いた。

B : WO 03/041495 号パンフレットに開示された方法に加えて、取得されたノックイン ES 細胞について以下の処理を実施した。

(1) 導入遺伝子下流域に存在するピューロマイシン耐性遺伝子カセットを Cre/loxP システムにより除去した。

(2) 導入遺伝子下流域に存在するピューロマイシン耐性遺伝子カセット、及び RS 領域に存在するネオマイシン耐性遺伝子カセットを Cre/loxP システムにより除去した。

WO 03/041495 号パンフレットに開示された方法に加えて、上記 A に示された方法を実施した結果、従来の開示と比較して 10 倍以上の発現量（血清中濃度）向上が観察された。従来の開示と同じプロモーター領域と、今回新たに検討した異なるプロモーター領域の比較では、後者の方がその効果は大きかった。また、WO 03/041495 号パンフレットに開示された方法に加えて上記 B に示された方法を実施しても、従来の開示と比較して 10 倍以上の発現量（血清中濃度）向上が観察された。さらに驚くべきことに、A と B を同時に実施することにより、従来の開示と比較して 100 倍以上の発現量（血清中濃度）向上が観察された。

本発明における方法 A、方法 B、及びこの 2 種を組み合わせた方法 AB による例示的ノックインキメラマウスにおいて観察されたヒトエリスロポエチン（hEPO）の血清中濃度は、従来のトランスジェニック（Tg）動物作製法あるいはウイルスベクター投与による外来 DNA 強制発現システムと比較して驚くべき高いレベルであった。正常動物の血清中における内在性 EPO 濃度は 10pg/ml 以下であると考えられているが、それが外来 DNA の発現により 100pg/ml 以上に高められることにより、赤血球増加の表現型が現われる。例えば初めて作製された hEPO-Tg マウスに

においては、100-150pg/ml の血清中 hEPO が検出されるとともに、赤血球増加の表現型が観察された (Semenza ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:2301-2305, 1989)。さらに最近になって作製されたより高いレベルの hEPO を発現する Tg マウスにおいては約 1250pg/ml の血清中 hEPO が検出され、髄外造血を伴う脾臓の肥大や 0.9 以上のヘマトクリット値など、前記 Tg マウスと比較してよりシビアな表現型が観察された (Ruschitzka ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:11609-11613)。一方、WO 03/041495 号パンフレットに開示された Ig κ プロモーターを含む hEPO 発現ユニットが C κ エクソンポリ A 付加部位下流に挿入されたノックインキメラマウスにおいては、数 ng/ml の血清中 hEPO 濃度が検出され、前記した従来法による Tg マウスより高い発現量であることが示された。hEPO 遺伝子発現カセットを含むアデノ随伴ウイルス、あるいはレトロウイルスのマウスへの投与による強制発現において検出された血清中 hEPO 濃度は概ね数 ng/ml 程度であった (Villeval ら、Leukemia, 6:107-115, 1992; Kessker ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14082-14087, 1996)。

後述の実施例に記載するように、WO 03/041495 号パンフレットに開示された方法に加えて、方法 A のみを実施した場合 45ng/ml 以上、また方法 B のみを実施した場合にも 50ng/ml 以上の血清中 hEPO が検出された。さらに方法 A、B を同時に実施した場合には 1000ng/ml 以上という驚くべきレベルの血清中 hEPO が検出された。この値は、従来法により作製された hEPO 発現 Tg マウスの最も高発現な例と比較して実に数百倍以上のレベルであった。すなわち、本発明の方法はトランジェニック動物における外来 DNA 発現のために有用であることが示された。

## 発明の概要

上記の知見に基づく本発明は、要約すると以下のとおりである。

本発明は、その第 1 の態様において、特定の細胞および/または組織において発現する遺伝子の制御領域によって所望の蛋白質の発現が制御されるべく該所望の蛋白質をコードする外来 DNA を含む、非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞であって、該特定の細胞および/または組織において発現する遺伝子由来のリーダー配列コード領域を含む核酸断片が該外来 DNA に結合されていることを特徴

とする前記細胞を提供する。

あるいは、本発明は、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の制御領域によって所望の蛋白質の発現が制御されるべく該所望の蛋白質をコードする外来DNAをゲノム上に含む、非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞であって、該特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子由来のリーダー配列コード領域を含む核酸断片が該外来DNAに結合されていることを特徴とする前記細胞を提供する。

このような構成のために、本発明は、前記細胞に由来するキメラ非ヒト動物またはその子孫において前記所望の蛋白質をコードする外来DNAが有意に過剰発現するという利点を提供する。

本発明の一実施形態において、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子は、免疫グロブリン遺伝子、好ましくは免疫グロブリン軽鎖遺伝子、さらに好ましくは免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子である。

本発明の別の実施形態において、前記核酸断片は、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターをさらに含むことができる。核酸断片はさらに、プロモーターに加えて、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターとリーダー配列コード領域との間の5'非翻訳領域の一部もしくは全部をさらに含むことができる。

本発明の別の実施形態において、前記核酸断片は、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーター／5'非翻訳領域の一部もしくは全部／リーダー配列コード領域を含む核酸配列からなる。このような核酸断片は、本発明において特に好ましいものである。その一具体例が、前記非ヒト動物由来の免疫グロブリン遺伝子のプロモーター／5'非翻訳領域の一部もしくは全部／リーダー配列コード領域を含む核酸断片である。ここで、5'非翻訳領域は全体からなることがさらに好ましい。

本発明の別の実施形態において、前記核酸断片は300塩基対より大きい長さを有する。核酸断片の長さは、例えば350～500塩基対、400～450塩基対などであるが、これに限定されない。

本発明の別の実施形態において、前記所望の蛋白質をコードする外来DNAの下

流にポリ A シグナル領域をコードする配列が結合されている。

本発明の別の実施形態において、前記分化多能性を有する細胞において前記外来 DNA のゲノムへの導入のために使用された 1 もしくは複数の薬剤耐性マーカー遺伝子が除去されている。好ましくは、すべての該薬剤耐性マーカー遺伝子が除去されている。例えば後述の実施例では、外来 DNA をゲノム上に相同的に組み換える際に非ヒト動物、具体的にはマウスのゲノム免疫グロブリン遺伝子（特に免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子）の下流に存在する RS エレメントまたはそれと同等の機能を有する領域に薬剤耐性マーカー遺伝子を挿入するが、外来 DNA を相同的に組み込んだあとに、この薬剤耐性マーカー遺伝子が除去される。

本発明においては、前記核酸断片が特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターとリーダー配列コード領域との間の 5' 非翻訳領域の一部もしくは全部をさらに含むこと、ならびに前記外来 DNA のゲノムへの導入のために使用された 1 もしくは複数の薬剤耐性マーカー遺伝子が除去されていること、を特徴とする分化多能性を有する細胞が特に好ましい。

本発明の別の実施形態において、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の対立遺伝子は不活性化されている。

本発明の別の実施形態において、前記分化多能性を有する細胞は胚性幹（ES）細胞である。ES 細胞は、例えばマウス ES 細胞である。

本発明はまた、その第 2 の態様において、上記の非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞を作製し、宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程、該キメラ胚を同種の仮親非ヒト動物に移植する工程、移植したのち得られた仔動物の中から、所望の蛋白質をコードする外来 DNA を発現するキメラ非ヒト動物を選抜する工程を含む、該所望の蛋白質をコードする外来 DNA を過剰発現するキメラ非ヒト動物の作製方法を提供する。

一実施形態において、前記キメラ非ヒト動物はマウスである。

別の実施形態において、前記分化多能性を有する細胞は ES 細胞である。

本発明はさらに、その第 3 の態様において、上記の方法によって作製された、かつ所望の蛋白質をコードする外来 DNA が過剰発現することを特徴とするキメラ非ヒト動物を提供する。

本発明はさらに、その第4の態様において、上記のキメラ非ヒト動物同士、または該キメラ非ヒト動物とそれと同種の非ヒト動物、を交配することにより作製された、かつ所望の蛋白質をコードする外来DNAが過剰発現することを特徴とする子孫非ヒト動物を提供する。

本発明はまた、その第5の態様において、上記のキメラ非ヒト動物または子孫非ヒト動物、あるいは該動物由来の細胞、組織またはハイブリドーマのいずれかを用いて所望の外来DNAを発現し、產生される該DNAによってコードされる蛋白質を回収することを含む、蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、その第6の態様において、上記のキメラ非ヒト動物または子孫非ヒト動物の表現型を、所望の蛋白質をコードする外来DNAを含まない対応の野生型非ヒト動物の表現型と比較し、それらの表現型の違いを決定することを含む、所望の蛋白質または所望の蛋白質をコードするDNAの生体内機能を解析する方法を提供する。

本発明に関わる用語の定義は以下の通りである。

本明細書中で使用される「ゲノム」という用語は、生物細胞の核に含まれる、遺伝情報を担う染色体DNAをいう。

本明細書中で使用される「非ヒト動物」という用語は、ヒトを含まない動物を意味し、一般に魚類、爬虫類、両生類、鳥類、哺乳類からなる脊椎動物、好ましくは哺乳類から選ばれる。本発明ではキメラ非ヒト動物の作製において、分化多能性を有する細胞として胚性幹細胞を利用するが好ましいため、胚性幹細胞の樹立が可能な非ヒト動物（たとえばマウス、ウシ、ヒツジ、ブタ、ハムスター、サル、ヤギ、ウサギ、ラットなど）、および将来的に胚性幹細胞の樹立が可能であろうその他の非ヒト動物のすべてが、本発明の意図する非ヒト動物に包含される。

「キメラ非ヒト動物」とは、分化多能性を有する細胞（後述）に由来する分化した細胞と、宿主胚に由来する分化した細胞の両者から成り立つ動物を意味する（Bradleyら、Nature, 309:255-6, 1984）。実験的には、すべての細胞が宿主胚に由来する動物（0%キメラ）や、すべての細胞が分化多能性を有する細胞に由来する動物（100%キメラ）も誕生しうるものであり、厳密にはこれらの動物は「キメラ」ではないが、便宜上「キメラ非ヒト動物」に包含されるものとする。

本明細書中で使用される「分化多能性を有する細胞」とは、上述したキメラ非ヒト動物を作製するにあたり、宿主胚への注入、あるいは集合胚形成によって、キメラ非ヒト動物の2種類以上の細胞または組織に分化可能な細胞を意味する。具体的には、胚性幹細胞(ES細胞)、胚性生殖細胞(EG細胞)、胚性腫瘍細胞(EC細胞)などが挙げられる。

本明細書中で使用される「胚性幹細胞」とは、ES細胞(embryonic stem cell)とも称され、未分化性(全能性)を維持したまま増殖可能なことを特徴とする初期胚由来の培養細胞を意味する。すなわち胚性幹細胞は、動物の初期胚中の胚盤胞の内部に存在する未分化幹細胞である内部細胞塊の細胞を培養し、未分化状態を保ったままで増殖し続けるように樹立された細胞株である。また「胚性生殖細胞」とは、EG細胞とも称され、上記胚性幹細胞とほぼ同等の能力を有することを特徴とする始原生殖細胞由来の培養細胞を意味する。胚性生殖細胞は、受精後数日～数週間、例えばマウスの場合には約8.5日経過した胚から得た始原生殖細胞を培養し、未分化状態を保ったままで増殖し続けるように樹立された細胞株である。

本明細書中で使用される「所望の蛋白質」とは、本発明の方法により作製されるキメラ非ヒト動物の少なくとも1種類の細胞および/または組織において発現させることが試みられる蛋白質であり、その機能については既知である場合も、未知である場合もある。前記所望の蛋白質は、哺乳動物由来の機能性分泌蛋白質、機能性膜蛋白質、機能性細胞内または核内蛋白質、分泌シグナルが付加された機能性膜蛋白質の可溶性部分などとすることができます。ここで「機能性」とは、生体内において特定の働き、作用または機能をもつことを意味する。機能既知の蛋白質の場合は、当該蛋白質がキメラ非ヒト動物の少なくとも1種類の細胞および/または組織における高発現の影響を観察することによって、蛋白質の機能の相互的関連について新たな知見を得られる可能性がある。機能未知の蛋白質の場合は、同じく高発現の影響を観察することによって、当該蛋白質の機能解明につながる知見を得られる可能性がある。本発明において「所望の蛋白質」は、導入するキメラ非ヒト動物において発現するが、発現させる対象となる特定の細胞および/または組織においては発現しないかもしくはわずかにしか発現しないものあ

ってもよいし、または異種動物由来のものであってもよく、関心のあるものであればその種類を問わないものとする。

本明細書中で使用される「所望の蛋白質をコードする核酸配列」は、内因性または外因性 DNA のいずれでもよく、また外因性 DNA にはヒト由来 DNA が含まれる。また本明細書においては、「所望の蛋白質をコードする構造遺伝子」という用語も同義として用いる。

本明細書中で使用される、蛋白質の「発現」とは、その蛋白質をコードする遺伝子の発現と同等の意味を有する。

本明細書中で使用される「リーダー配列コード領域」は、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の翻訳開始コドンの 5' 上流の領域であって、いわゆる前駆体蛋白質配列から成熟蛋白質配列部分を除いた N 末端側配列部分をコードする核酸配列を含む領域を指し、「分泌シグナル配列」または「シグナルペプチドコード領域」(signal peptide coding region) を含む。

本明細書中で使用される「制御領域」とは、「制御配列」、「調節配列」、「調節領域」などの総称を意味し、遺伝子発現（転写、翻訳または蛋白質合成）を制御または調節する機能を有する領域を指す。そのような制御領域としては、限定するものではないが、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなどが含まれる。また、本発明において「制御領域」とは、1 つの機能的なエレメント（例えば1 つのプロモーター配列）を含むものであってもよいし、または複数のエレメントを含むもの（例えば、1 つのプロモーター配列と1 つのエンハンサー配列など）であってもよい。さらに「プロモーター配列」とは、当業者に周知の制御領域の1 種であり、転写開始時に RNA ポリメラーゼが結合する構造遺伝子上流の塩基配列を指す。

本明細書中で使用する「インターナルリボゾーマルエントリーサイト」とは、IRES (internal ribosomal entry site) と略称され、ポリシストロニックな発現を可能にするエレメントとして知られており、特殊な RNA 二次構造を形成し、その下流にある開始コドンからのリボソームによる翻訳開始を可能にする部位を指す。哺乳動物の場合、IRES はリボゾームのデコードサブユニットに結合し、これにより隣接する蛋白質コード領域をデコード部位に引き込むような立体構造変化

を起こして、翻訳および蛋白質合成を開始する事象に関わると推定されている (Spahn ら, Science 291:1959, 2001)。

本明細書中で使用する「ポリ A シグナル領域」とは、転写領域の終わりの部分に位置し、転写後 mRNA 前駆体の 3' 非翻訳領域へポリアデニル酸鎖付加を指令する塩基配列部分を指す。

本明細書中で使用する「上流」および「下流」とは、ゲノム、ポリヌクレオチドなどの核酸配列において、それぞれ 5' 末端及び 3' 末端への方向を指す。

本明細書中で使用する「bp (塩基対)」及び「Kb (キロ塩基対)」とは、核酸配列の長さ及び距離を指し、1 bp が 1 つの塩基対を表し、1 Kb は 1000bp に相当する。

本明細書中で使用する「対立遺伝子」とは、倍数体のゲノムを有する生物において、相同染色体の相同的な領域に位置し、機能的にも相同的な遺伝子をいう。対立遺伝子は通常全てが発現される。また「対立遺伝子排除」とは、生物個体で考えた場合、対立遺伝子の両方に由来する形質が表現されているにもかかわらず、個々の細胞では対立遺伝子のどちらかのみがランダムに発現し、他方の発現が排除されていることをいう。例えば抗体や T 細胞受容体の遺伝子に見られ、一方の可変領域遺伝子の組換えが信号となって完全な遺伝子が 1 つしか完成されないことによる。

本明細書中で使用する「分泌シグナルを付加された膜蛋白質の可溶性部分」という用語は、膜蛋白質分子のうち、分泌シグナル（またはシグナル配列）が結合した細胞外ドメインを意味する。

本明細書中で使用する「免疫グロブリン軽鎖遺伝子」という用語は、免疫グロブリン (Ig) 分子の軽鎖（または L 鎖）をコードしている遺伝子を指す。軽鎖には  $\kappa$  鎖と  $\lambda$  鎖が含まれており、可変 (V) 領域と定常 (C) 領域から構成されている。また軽鎖遺伝子は、1 個の C 領域遺伝子、複数の V 領域遺伝子、および複数の結合 (J) 領域遺伝子から構成されている。本発明では軽鎖定常領域遺伝子が好ましく、特にマウスの分化多能性を有する細胞を使用する場合  $\kappa$  軽鎖定常領域遺伝子がさらに好ましい。哺乳動物の中でも特にヒトやマウスのゲノム解析はほぼ終了しており、ゲノム情報は入手可能な状態にあること、また解析の結果、ゲノ

ムにおける配列の相同性比較から、ヒトとマウスの間では約 85%の相同率であり、かなり類似していることを考慮するならば、動物種としてマウスの分化多能性を有する細胞を使用するのが好ましいといえる。しかし、本発明では、マウス以外の動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ハムスター、サル、ヤギ、ウサギ、ラットなど）の使用も可能であり、免疫グロブリン遺伝子の配列決定がすでになされているものについては文献又は GenBank(米国 NCBI)、EMBL(欧州 EBI)などのデータベースからその情報を入手することができるし、配列が不明の場合には、制限酵素によるゲノム DNA の断片化、マッピング、ゲノムライブラリーの作成、クローニング、(自動)シークエンシングなどの慣用技術を組み合わせることによって遺伝子の配列を決定できる (S. B. プリムローズ著、藤山秋佐夫監訳、ゲノム解析ベーシック、1996 年、シュプリンガー・フェアラーク東京)。免疫グロブリン遺伝子の配列情報は、例えば GenBank 受託番号 NG004051(マウス IgG  $\lambda$ )、V01569(マウス IgG  $\kappa$  定常領域) として記載されており利用可能である。

本明細書中で使用する「特定の細胞および／または組織が欠損した非ヒト動物系統の宿主胚」または「欠損宿主胚」という用語は、分化多能性を有する細胞を注入するための宿主非ヒト動物胚であって、当該細胞および／または組織を欠損する胚を意味する。

本明細書中で使用するキメラ非ヒト動物の「子孫」とは、本発明のキメラ非ヒト動物同士、あるいは本発明のキメラ非ヒト動物とそれと同種の非ヒト動物、の交配により得られ、少なくとも特定の細胞および／または組織において所望の蛋白質を発現する非ヒト動物を意味する。

本明細書中で使用する「表現型」とは、動物が本来持つ形質、または導入遺伝子の結果現れる動物の形質を指す。

本明細書中で使用する「増殖可能な腫瘍細胞」とは、腫瘍化することにより永続的な増殖能を有する細胞を意味し、例えば免疫グロブリンを産生する形質細胞腫細胞（ミエローマ細胞など）が挙げられる。

本明細書中で使用する「ハイブリドーマ」という用語は、本発明のキメラ非ヒト動物またはその子孫からの組織または細胞に由来する細胞と、上記増殖可能な腫瘍細胞とを融合させてできる雑種細胞を指す。

本明細書中で使用する「ターゲティングベクター」とは、相同組換えにより目的とする染色体領域に所望の蛋白質をコードする遺伝子の発現ユニットを導入し、該所望の蛋白質を発現させるために用いるベクターを指す。本明細書中で使用する「ノックアウトベクター」とは、相同組換えにより非ヒト動物の目的とする遺伝子を破壊または不活性化するためのベクターを指す。また「ノックアウト」もしくは「遺伝子ノックアウト」とは、目的とする遺伝子座位に相同組換えにより当該遺伝子の発現を阻害する構造を導入し、該目的の遺伝子を破壊または不活性化することを意味する。

本明細書中で使用する「RS (Recombining segment) エレメント」という用語は、6番染色体上のマウス免疫グロブリン $\kappa$ 軽鎖定常領域遺伝子の約 25Kb 下流に位置し、nonamer 及び heptamer signal sequence (下線部分) を持つ以下の配列 (agtttctgcacggcagtcagtttagcagcactcactgtg (配列番号 65)) を指す (Daitch ら、J. Immunol., 149: 832-840, 1992)。 $\lambda$ 鎖発現 B 細胞の多くは解析の結果、C $\kappa$ エクソンないしは J $\kappa$ -C $\kappa$ 領域が欠失しているが、これらの欠失はマウス 6 番染色体上の C $\kappa$ エクソン下流 25Kb に位置する DNA 配列 (Recombining sequence or RS エレメント) との組み換えによるものであることが報告されている (Durdik ら、Nature, 307, 749-752, 1984; Moore ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。マウス以外の哺乳動物にもゲノム免疫グロブリン遺伝子の下流に RS エレメントと同等の機能を有する領域があり、外来 DNA をゲノムに相同的に組み込む際に、RS エレメントと同様にこの領域に薬剤耐性マーカー遺伝子を組み込むことによって、外来 DNA の相同組換え率を向上させることができる。

本発明は、本発明のキメラ非ヒト動物またはその子孫、あるいは該動物由來の細胞、組織またはハイブリドーマは、従来と比べて有意に高いレベル、例えば数百倍高いレベル、の外来 DNA 発現を可能にするという利点を付与する。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2005-014826 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、pPSs-hEP0 in vitro 用ベクターの構造を示す。5' エンハンサー:マウ

ス Ig $\kappa$  の 5' エンハンサー領域、PS プロモーター:マウス Ig $\kappa$  プロモーター領域 PS、シグナルペプチドコード領域 (Signal peptide coding region) :PS プロモーター下流のマウス Ig $\kappa$  シグナルペプチドコード領域、イントロン:マウス Ig $\kappa$  シグナルペプチドコード領域にはさまれたイントロン領域、hEPO(-SP):固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒト EPO 遺伝子、polyA:マウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、3' エンハンサー:マウス Ig $\kappa$  の 3' エンハンサー領域、Amp:アンピシリン耐性遺伝子。

図 2 は、pNPs hEPO in vitro 用ベクターの構造を示す。5' エンハンサー:マウス Ig $\kappa$  の 5' エンハンサー領域、NP プロモーター:マウス Ig $\kappa$  プロモーター領域 NP、シグナルペプチドコード領域:NP プロモーター下流のマウス Ig $\kappa$  シグナルペプチドコード領域、イントロン:マウス Ig $\kappa$  シグナルペプチドコード領域にはさまれたイントロン領域、hEPO(-SP):固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒト EPO 遺伝子、ポリ A:マウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、3' エンハンサー:マウス Ig $\kappa$  の 3' エンハンサー領域、Amp:アンピシリン耐性遺伝子。

図 3 は、pCks hEPO in vitro 用ベクターの構造を示す。5' エンハンサー:マウス Ig $\kappa$  の 5' エンハンサー領域、P2 プロモーター:マウス Ig $\kappa$  プロモーター領域 2、hEPO:ヒト EPO 遺伝子、ポリ A:マウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、3' エンハンサー:マウス Ig $\kappa$  の 3' エンハンサー領域、Amp:アンピシリン耐性遺伝子。

図 4 は、ミエローマ細胞に pNPs hEPO in vitro 用ベクター、pPSs hEPO in vitro 用ベクター、pCks hEPO in vitro 用ベクターを導入後、取得された RNA を用いた RT-PCR 解析実施結果を示す。hEPO:ヒト EPO、RT(-):逆転写反応を行わず PCR を実施。

図 5 は、ミエローマ細胞に pCks hEPO in vitro 用ベクター、pNPs hEPO in vitro 用ベクター、pPSs hEPO in vitro 用ベクターを導入後、ELISA を用いて培養上清中のヒト EPO 濃度を測定した値を示す。図 5A は測定値の棒グラフを、図 5B は測定値の平均値をそれぞれ示す。

図 6 は、マウス RS エレメントターゲティング用ベクター pBlueRS-LoxP-Neo-DT-A-3' K0-5' K0 の構造を示す。5' K0:マウス RS エレメント 5' 上流領域、Neo<sup>r</sup>:loxP 配列を両端に持つネオマイシン耐性遺伝子、3

’K0：マウス RS エレメント 3’ 下流領域、DT-A：ジフテリアトキシン A鎖遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図 7 は、マウス RS エレメントの代わりにネオマイシン耐性遺伝子が挿入されたアレル構造（図 7A）およびサザン解析用プローブの位置（図 7B）を示す。5’ ゲノム：マウス RS エレメント 5’ 上流領域、3’ ゲノム：マウス RS エレメント 3’ 下流領域、5’ プローブ：ターゲティングベクターの 5’ 側挿入確認用サザン解析プローブ、3’ プローブ：ターゲティングベクターの 3’ 側挿入確認用サザン解析プローブ、loxP-Neo-loxP：loxP 配列をその両端に持つネオマイシン耐性遺伝子。

図 8 は、pC $\kappa$ P2 KI ベクターの構造を示す。プロモーター 2：マウス Ig $\kappa$  プロモーター領域 2、MCS：マルチクローニング部位、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$  遺伝子定常領域、完全長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 436bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、部分長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 309bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、loxP-Puro：loxP 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシン A鎖遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図 9 は、ヒト EPO 遺伝子がクローニングサイトに挿入された pC $\kappa$ P2 hEPO KI ベクター構造を示す。プロモーター 2：マウス Ig $\kappa$  プロモーター領域 2、hEPO：ヒト EPO 遺伝子、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$  遺伝子定常領域、完全長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 436bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、部分長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 309bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、loxP-Puro：loxP 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシン A鎖遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図 10 は、薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo) がターゲティングされたアレル構造、ヒト EPO 遺伝子+薬剤耐性遺伝子 (loxP-puro) が pC $\kappa$  hEPO KI ベクターを用いてターゲティングされたアレル構造、2 種の薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo, loxP-puro) が同時に除去されたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。hEPO：ヒト EPO 遺伝子、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$  遺伝子定常領域、loxP-puro：loxP 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、loxP-neo：loxP 配列をその両端に持つネオマイシン耐性遺伝子、Ck3’ プローブ：hEPO+loxP-puro 遺伝子導入お

および loxp-puro 遺伝子除去クローン選別用サザン解析プローブ、RS3' プローブ： loxp-neo 遺伝子導入および除去クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI 制限酵素サイト。

図 1 1 は、固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒト EPO 遺伝子がクローニングサイトに挿入された pNP hEPO KI ベクターの構造を示す。NP プロモーター：マウス Ig $\kappa$  プロモーター領域 NP、シグナルペプチドコード領域：NP プロモーター下流のマウス Ig $\kappa$  シグナルペプチドコード領域、hEPO(-SP)：固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒト EPO 遺伝子、完全長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 436bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、部分長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 309bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$  遺伝子定常領域、loxp-Puro：loxP 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシン A鎖遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図 1 2 は、ヒト EPO 遺伝子 + 薬剤耐性遺伝子 (loxp-puro) が pNP hEPO KI ベクターを用いてターゲティングされたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。hEPO(-SP)：固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒト EPO 遺伝子、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$  遺伝子定常領域、loxp-puro：loxP 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、Ck3' プローブ：hEPO(-SP)+loxp-puro 遺伝子導入クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI 制限酵素サイト。

図 1 3 は、固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒト EPO 遺伝子がクローニングサイトに挿入された pPS hEPO KI ベクターの構造を示す。PS プロモーター：マウス Ig $\kappa$  プロモーター領域 PS、シグナルペプチドコード領域：PS プロモーター下流のマウス Ig $\kappa$  シグナルペプチドコード領域、hEPO(-SP)：固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒト EPO 遺伝子、完全長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 436bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、部分長 C $\kappa$  ポリ A：C $\kappa$  終止コドン下流 309bp からなるマウス Ig $\kappa$  ポリ A シグナル領域、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$  遺伝子定常領域、loxp-Puro：loxP 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシン A鎖遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図14は、薬剤耐性遺伝子（loxP-neo）がターゲティングされたアレル構造、ヒトEP0+薬剤耐性遺伝子（loxP-puro）がpPS hEP0 KIベクターを用いてターゲティングされたアレル構造、薬剤耐性遺伝子（loxP-neo, loxP-puro）が除去されたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。hEP0(-S P)：固有のリーダー配列コード領域を除去したヒトEP0遺伝子、C<sub>κ</sub>：マウスIg<sub>κ</sub>遺伝子定常領域、loxP-puro：loxP配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、loxP-neo：loxP配列をその両端に持つネオマイシン耐性遺伝子、Ck3'プローブ：hEP0(-SP)+loxP-puro遺伝子導入およびloxP-puro遺伝子除去クローン選別用サザン解析プローブ、RS3'プローブ：loxP-neo遺伝子導入および除去クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI制限酵素サイト。

図15は、薬剤耐性遺伝子（loxP-neo）がターゲティングされたアレル構造、ヒトEP0+薬剤耐性遺伝子（loxP-puro）がpCkP2 hEP0 KIベクターを用いてターゲティングされたアレル構造、薬剤耐性遺伝子（loxP-neo, loxP-puro）が除去されたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。hEP0：ヒトEP0遺伝子、C<sub>κ</sub>：マウスIg<sub>κ</sub>遺伝子定常領域、loxP-puro：loxP配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、Ck3'プローブ：hEP0+loxP-puro遺伝子導入およびloxP-puro遺伝子除去クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI制限酵素サイト。

図16は、CkP2 hEP0マウスES細胞、NP hEP0マウスES細胞、PS hEP0マウスES細胞、RSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞より作製されたキメラマウス（1週齢から4週齢）の脾臓より調製されたRNAを用いたRT-PCR解析実施結果（アガロースゲル電気泳動のバンドを示す）。CkP2：CkP2 hEP0マウスES細胞より作製されたキメラマウスの脾臓から得られたサンプルの結果、NP：NP hEP0マウスES細胞より作製されたキメラマウスの脾臓から得られたサンプルの結果、PS：PS hEP0マウスES細胞より作製されたキメラマウスの脾臓から得られたサンプルの結果、RSe：RSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞より作製されたコントロールキメラマウスの脾臓から得られたサンプルの結果、EP0：ヒトEP0、GAPDH：マウスグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）、RT+：逆転写反応後にPCRの実

施、RT-：逆転写反応を行わず PCR の実施。

図 17 は、CkP2 hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、CkP2 ΔP EPO マウス TT2F 細胞由来キメラマウス、CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS loxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスにおける 1 週齢から 8 週齢までの血清中ヒト EPO 濃度を示す。図 17A は測定値のグラフを、図 17B は測定値をそれぞれ示す。(数字)：測定検体数を示す。

図 18 は、pCk loxPV KI ベクターの構造を示す。プロモーター 2：マウス Ig  $\kappa$  プロモーター領域 2、MCS：マルチクローニング部位、C  $\kappa$ ：マウス Ig  $\kappa$  遺伝子定常領域、完全長 C  $\kappa$  ポリ A：C  $\kappa$  終止コドン下流 436bp からなるマウス Ig  $\kappa$  ポリ A シグナル領域、部分長 C  $\kappa$  ポリ A：C  $\kappa$  終止コドン下流 309bp からなるマウス Ig  $\kappa$  ポリ A シグナル領域、loxPV-Puro：変異型 loxP 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシン A 鎮遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図 19 は、薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo) がターゲティングされたアレル構造、薬剤耐性遺伝子 (loxPv-puro) が pCk loxPV KI ベクターを用いてターゲティングされたアレル構造、薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo, loxPv-puro) が除去されたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。C  $\kappa$ ：マウス Ig  $\kappa$  遺伝子定常領域、loxPv-puro：loxP 配列の一部変異配列である loxPV 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、loxP-neo：loxP 配列をその両端に持つネオマイシン耐性遺伝子、Ck3' プローブ：loxPv-puro 遺伝子導入および loxPv-puro 遺伝子除去クローン選別用サザン解析プローブ、RS3' プローブ：loxP-neo 遺伝子導入および除去クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI 制限酵素サイト。

図 20 は、ヒト EPO 遺伝子がクローニングサイトに挿入された pCk loxPV hEPO KI ベクター構造を示す。プロモーター 2：マウス Ig  $\kappa$  プロモーター領域 2、hEPO：ヒト EPO 遺伝子、C  $\kappa$ ：マウス Ig  $\kappa$  遺伝子定常領域、完全長 C  $\kappa$  ポリ A：C  $\kappa$  終止コドン下流 436bp からなるマウス Ig  $\kappa$  ポリ A シグナル領域、部分長 C  $\kappa$  ポリ A：C  $\kappa$  終止コドン下流 309bp からなるマウス Ig  $\kappa$  ポリ A シグナル領域、loxPV-Puro：loxP 配列の一部変異配列である loxPV 配列をその両端に持つピューロマイシン耐

性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシンA鎖遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図21は、薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo) がターゲティングされたアレル構造、ヒトEPO遺伝子+薬剤耐性遺伝子 (loxPv-puro) が pCk loxPV hEPO KI ベクターを用いてターゲティングされたアレル構造、薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo, loxPv-puro) が除去されたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。hEPO：ヒトEPO遺伝子、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$ 遺伝子定常領域、loxPv-puro：loxP配列の一部変異配列である loxPV 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、loxP-neo：loxP 配列をその両端に持つネオマイシン耐性遺伝子、Ck3' プローブ：hEPO+loxPv-puro 遺伝子導入および loxPv-puro 遺伝子除去クローン選別用サザン解析プローブ、RS3' プローブ：loxP-neo 遺伝子導入および除去クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI 制限酵素サイト。

図22は、ヒトEPO遺伝子がクローニングサイトに挿入された pNP loxPV hEPO KI ベクター構造を示す。NPプロモーター：プロモーター2よりも約300bp長い上流配列を持つマウス Ig $\kappa$ プロモーター領域、シグナルペプチドコード領域：NPプロモーターアンダーフローのマウス Ig $\kappa$ シグナルペプチドコード領域、hEPO(-SP)：固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒトEPO遺伝子、完全長 C $\kappa$ ポリA：C $\kappa$ 終止コドン下流436bpからなるマウス Ig $\kappa$ ポリAシグナル領域、部分長 C $\kappa$ ポリA：C $\kappa$ 終止コドン下流309bpからなるマウス Ig $\kappa$ ポリAシグナル領域、loxPV-Puro：loxP配列の一部変異配列である loxPV 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシンA鎖遺伝子、および pBluescript：クローニングベクター。

図23は、薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo) がターゲティングされたアレル構造、ヒトEPO遺伝子+薬剤耐性遺伝子 (loxPv-puro) が pNP loxPV hEPO KI ベクターを用いてターゲティングされたアレル構造、薬剤耐性遺伝子 (loxP-neo, loxPv-puro) が除去されたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。hEPO(-SP)：固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒトEPO遺伝子、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$ 遺伝子定常領域、loxPv-puro：loxP配列の一部変異配列である loxPV 配列をその両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、loxP-neo：loxP配列をその

両端に持つネオマイシン耐性遺伝子、Ck3' プローブ：hEP0+loxpv-puro 遺伝子導入およびloxpv-puro 遺伝子除去クローン選別用サザン解析プローブ、RS3' プローブ：loxp-neo 遺伝子導入および除去クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI 制限酵素サイト。

図24は、ヒトEPO遺伝子がクローニングサイトに挿入されたpUS hEPOKIベクター構造を示す。PSプロモーター：マウス Ig $\kappa$ プロモーター領域PS、シグナルペプチドコード領域：PSプロモーターアンダーフロウのマウス Ig $\kappa$ シグナルペプチドコード領域、hEPO(-SP)：固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒトEPO遺伝子、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$ 遺伝子定常領域、完全長 C $\kappa$ ポリ A：C $\kappa$ 終止コドンアングラウド436bpからなるマウス Ig $\kappa$ ポリ Aシグナル領域、部分長 C $\kappa$ ポリ A：C $\kappa$ 終止コドンアングラウド309bpからなるマウス Ig $\kappa$ ポリ Aシグナル領域、loxPV-Puro：loxP配列の一部変異配列であるloxPV配列を両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、DT-A：ジフテリアトキシンA鎖遺伝子、およびpBluescript：クローニングベクター。

図25は、薬剤耐性遺伝子（loxp-neo）がターゲティングされたアレル構造、ヒトEPO+薬剤耐性遺伝子（loxpv-puro）がpPS loxPV hEPO KIベクターを用いてターゲティングされたアレル構造、薬剤耐性遺伝子（loxp-neo, loxpv-puro）が除去されたアレル構造およびサザン解析用プローブの位置を示す。hEPO(-SP)：固有のシグナルペプチドコード領域を持たないヒトEPO遺伝子、C $\kappa$ ：マウス Ig $\kappa$ 遺伝子定常領域、loxpv-puro：loxP配列の一部変異配列であるloxPV配列を両端に持つピューロマイシン耐性遺伝子、loxp-neo：loxP配列を両端に持つネオマイシン耐性遺伝子、Ck3' プローブ：hEP0+loxpv-puro 遺伝子導入およびloxpv-puro 遺伝子除去クローン選別用サザン解析プローブ、RS3' プローブ：loxp-neo 遺伝子導入および除去クローン選別用サザン解析プローブ、E：EcoRI 制限酵素サイト。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

- 特定の染色体領域に薬剤耐性マーカー遺伝子発現ユニットが挿入された分化多能性を有する細胞の作製

本発明のキメラ非ヒト動物の作製方法では、まず、所望の蛋白質をコードする核酸配列（例えば、構造遺伝子）を含む（あるいは、ゲノム上に含む）、非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞を作製する。この核酸配列は、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の制御領域によって所望の蛋白質の発現が制御されるように配置されたものである。

本発明において分化多能性を有する細胞としては、上記定義に挙げたものを利用することができるが、マウス由来の胚性幹細胞（ES 細胞）が好ましい。改変される染色体領域としては、RS エレメントが好ましく、特にマウス 6 番染色体上の免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖定常領域遺伝子の約 25Kb 下流に位置する RS エレメントが好ましい。

また、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子は、組織特異的に発現するものであってもよいし、または構成的に発現するものであってもよい。

本発明においては、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の近傍に、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターと連結された cDNA を含む発現ユニットを挿入することにより、該 cDNA が特定の細胞および／または組織において発現する。ここで特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子としては、非ヒト動物ゲノム上の内因性遺伝子だけでなく、非ヒト動物個体の染色体外で維持され得る外来遺伝因子、例えばプラスミドベクター（Elbrecht ら、Mol. Cell Biol., 7: 1276-1279, 1987）、ヒト染色体あるいはその断片（Tomizuka ら、Nat. Genet. 16: 133-143, 1997; Tomizuka ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 722-727, 2000）、またはヒト人工染色体ベクター（Kuroiwa ら、Gene Therapy, 9, 708-712, 2002）などに含まれる遺伝子を用いることができる。さらに、非ヒト動物個体の染色体に挿入された外来遺伝子断片上の遺伝子を用いることもできる（Mendez ら、Nat. Genet., 15, 146-156, 1997）。例えば、富塚らはヒト 14 番染色体断片（SC20）を保持し、子孫伝達するトランスクロモンミックマウス系統について報告している（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 722-727, 2000）。SC20 断片はヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座全長を含み、該トランスクロモンミックマウスにおいては、ヒトで観察されるのと同様に多様なヒト免疫グロブリン重鎖が、B リンパ球特異的に発現することが示されている。す

なわち、SC20 断片上のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座近傍に、免疫グロブリン重鎖プロモーターと cDNA が連結されている発現ユニットを挿入することにより、B リンパ球特異的な該 cDNA の発現が可能となる。

例えば組織特異的に発現する遺伝子としては、免疫グロブリン軽鎖または重鎖遺伝子、T 細胞受容体遺伝子、ミオグロビン遺伝子、クリスタリン遺伝子、レニン遺伝子、リパーゼ遺伝子、アルブミン遺伝子などが挙げられる。また構成的に発現する遺伝子としては、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子などが挙げられる。当該遺伝子がキメラ非ヒト動物において組織特異的に発現する遺伝子の場合には、後述する宿主胚として、当該遺伝子の発現する細胞および／または組織が欠損した系統の胚を採用する。当該遺伝子が構成的に発現する遺伝子の場合は、後述する宿主胚として、任意の細胞および／または組織が欠損した系統の胚を採用する。

所望の蛋白質をコードする核酸配列の配置（すなわち、連結または挿入）は、少なくとも特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の制御領域によって所望の蛋白質の発現が制御されるような形態である必要がある。従って、該核酸配列は、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の制御領域の下流に配置される。

あるいは、該所望の蛋白質をコードする核酸配列は、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の終止コドンとポリ A シグナル領域をコードする配列の間に、インターナルリボゾーマルエントリーサイト (IRES) を配置し、その IRES の下流に配置される。すなわち、該核酸配列は、ゲノム上において、IRES と機能的に連結された状態で、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の終止コドンとポリ A シグナル領域をコードする配列との間に存在する。ターゲティングベクターの構築に際して、ポリ A シグナル領域は上記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナル領域を用いることができるが、これに限定されるものではない。例えば、シミアンウイルス 40 (SV40) 由来のポリ A シグナル領域などの当技術分野で公知の他のポリ A 配列を用いることもできる。

また該所望の蛋白質をコードする核酸配列は、特定の細胞および／または組織

において発現する遺伝子の終止コドンとポリ A シグナル領域をコードする配列の間に、第 2 のポリ A シグナル領域をコードする配列、そのポリ A シグナル領域の下流にプロモーター配列を配置し、さらに該プロモーター配列の下流に配置される。すなわち、該核酸配列は、ゲノム上において、プロモーター配列およびポリ A シグナル領域をコードする配列と機能的に連結された状態で存在し、かつもともとゲノム上に存在する特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子もまたそのプロモーター配列およびポリ A シグナル領域をコードする配列と機能的に連結された状態で存在する。ターゲティングベクターの構築に際して、ここで使用されるプロモーター配列は、上記特定の細胞および／または組織において発現を制御するものであれば特に限定されることはないが、好ましくは上記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターが用いられる。またターゲティングベクターにプロモーターが 2 つ存在する場合には、その 2 つのプロモーターは、同じ細胞および／または組織において発現を制御するものであれば、同じものであってもよいし異なるものであってもよい。さらにターゲティングベクターの構築において使用されるポリ A シグナル領域をコードする配列としては、当技術分野で公知のポリ A シグナル領域であれば特に限定されるものではなく、例えばプロモーターと同じ由来のポリ A シグナル領域やシミアンウイルス 40 (SV40) 由来のポリ A シグナル領域などが挙げられる。またプロモーターの場合と同様に、ターゲティングベクターに 2 つのポリ A シグナル領域をコードする配列が存在する場合には、その 2 つは同じものであってもよいし異なるものであってもよい。

さらにまた前記所望の蛋白質をコードする核酸配列は、上記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナル領域の下流に、プロモーター配列、核酸配列、およびポリ A シグナル領域をコードする配列の順に配置することもできる。すなわち、該核酸配列は、プロモーターおよびポリ A シグナル領域をコードする配列と機能的に連結された状態（例えば、カセット形式）で、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナルの下流に存在する。ターゲティングベクターの構築に際して、ここで使用されるプロモーター配列は、上記特定の細胞および／または組織において発現を制御するもの

であれば特に限定されることはないが、好ましくは上記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターが用いられる。さらにターゲティングベクターの構築においてポリ A シグナル領域をコードする配列としては、当技術分野で公知のポリ A シグナル領域であれば特に限定されるものではなく、例えばプロモーターと同じ由来のポリ A シグナル領域やシミアンウイルス 40 (SV40) 由来のポリ A シグナル領域などが挙げられる。またターゲティングベクターに 2 つのポリ A シグナル領域をコードする配列が存在する場合には、その 2 つは同じものであってもよいし異なるものであってもよい。前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナル領域の 3' 端と、所望の蛋白質をコードする核酸配列の発現を制御するプロモーター配列の 5' 端の距離は、上記特定の細胞および／または組織において該核酸配列の発現が可能であれば特に限定されるものではないが、距離が離れるに従い、転写産物である mRNA の安定性に好ましくない影響が生じる可能性があり、またターゲッティングベクターの構造が大きくなることからそのような構成のベクターの作製が困難になる。これらの理由からポリ A シグナル領域の 3' 端と、所望の蛋白質をコードする核酸配列の発現を制御するプロモーター配列の 5' 端の距離は 1 Kb 以内であることが好ましい。

また前記所望の蛋白質をコードする核酸配列は、上記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナル領域の下流に、上記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子由来のプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列、所望のタンパク質をコードする核酸配列よりリーダー配列コード領域を除去した配列、およびポリ A シグナル領域をコードする配列の順に配置することもできる。すなわち、該所望のタンパク質をコードする核酸配列よりリーダー配列コード領域を除去した核酸配列は、プロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列およびポリ A シグナル領域をコードする配列と機能的に連結された状態（例えば、カセット形式）で、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナルの下流に存在する。ターゲティングベクターの構築に際して、ここで使用されるプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列は、上記特定の細胞お

および／または組織において発現を制御するものであれば特に限定されることはないが、好ましくは上記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列が用いられる。また、プロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列は、ゲノム上に存在する一続きの配列のままであってもよいし、プロモーター、5' 非翻訳領域、リーダー配列コード領域、の各機能領域を人工的に連結させることにより作製されたものであってもよい。また、ここで使用される 5' 非翻訳領域及びリーダー配列コード領域にはインtronが含まれてもよいし、含まれなくてもよい。本発明における好ましい様態として、プロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域はマウス免疫グロブリン $\kappa$  軽鎖遺伝子由来のものである。マウス免疫グロブリン $\kappa$  軽鎖遺伝子においては、ゲノム上に多数の可変 (V) 領域セグメントが存在し、それぞれが固有のプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域を伴っている。マウス免疫グロブリン $\kappa$  軽鎖遺伝子由来のプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域としては、多数存在する可変 (V) 領域のいずれに付随するプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域を使用してもよい。マウス免疫グロブリン $\kappa$  軽鎖遺伝子由来のプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域として好ましくは、実施例記載の NP 型であり、さらに好ましくは実施例記載の PS 型である。

さらにターゲティングベクターの構築においてポリ A シグナル領域をコードする配列としては、当技術分野で公知のポリ A シグナル領域であれば特に限定されるものではなく、例えばプロモーターと同じ由来のポリ A シグナル領域やシミアンウイルス 40 (SV40) 由来のポリ A シグナル領域などが挙げられる。またターゲティングベクターに 2 つのポリ A シグナル領域をコードする配列が存在する場合には、その 2 つは同じものであってもよいし異なるものであってもよい。ポリ A シグナル領域をコードする配列として好ましい様態はマウス免疫グロブリン $\kappa$  鎖遺伝子 C $\kappa$  エクソン下流に位置するポリ A シグナルである。前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナル領域の 3' 端と、所望の蛋白質をコードする核酸配列の発現を制御するプロモーター配列の 5' 端の距離は、上記特定の細胞および／または組織において該核酸配列の発現が可能であ

れば特に限定されるものではないが、距離が離れるに従い、転写産物である mRNA の安定性に好ましくない影響が生じる可能性があり、またターゲッティングベクターの構造が大きくなることからそのような構成のベクターの作製が困難になる。これらの理由からポリ A シグナル領域の 3' 端と、所望の蛋白質をコードする核酸配列の発現を制御するプロモーター配列の 5' 端の距離は 1 Kb 以内であることが好ましい。

所望の蛋白質をコードする核酸配列（例えば、構造遺伝子など）を前記制御領域の近傍に配置する場合には、核酸配列を該制御領域の近傍に挿入してもよいし、または、ES 細胞の片側のアレルについて、単に当該細胞および／または組織において発現する遺伝子の制御配列の直下に、本来の構造遺伝子を置換するような態様で配置することもできる。所望の蛋白質をコードする核酸配列に置換された本来の構造遺伝子は、もう片側のアレルによって発現されるので、細胞および／または組織は正常な状態を保ちうる。

免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子の発現は、前述した通り多数の V および J 遺伝子断片が、組換えにより結合することより起こる。この結合の結果、各 V 遺伝子断片の上流近傍にあるプロモーター配列は J 断片下流に存在するエンハンサー配列の近傍に配置される。このような状況において、エンハンサー配列は初めて該プロモーターを活性化することができる (Picard ら、Nature, 307:80-2, 1984)。すなわち、前記所望の蛋白質をコードする核酸配列は、人為的に免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子のプロモーター配列と連結した形で、前記エンハンサー配列の近傍に配置することもできる。また所望のタンパク質をコードする核酸配列よりリーダー配列コード領域を除去した配列は、人為的に免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子由来のプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列と連結した形で、前記エンハンサー配列の近傍に配置することもできる。免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子座には前記エンハンサー配列以外にもさらに下流にエンハンサー配列が存在することが知られており (Meyer ら、EMBO J. 8:1959-64, 1989)、該遺伝子はこのように複数のエンハンサーの影響のもと B 細胞において高発現することができる。

上述したような所望の蛋白質をコードする核酸配列をゲノム上に含む非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞を、以下遺伝子導入細胞または遺伝子導入 ES

細胞とも呼び、これらの細胞は、限定するものではないが、例えば以下に記載するように得ることができる。

### 1-1. 遺伝子導入 ES 細胞の取得

#### (1) RS エレメント・ターゲティングベクターの構築

マウス RS エレメント配列の上流及び下流領域にゲノム配列を持ち、RS エレメント配列の位置に選択マーカーが代わりに挿入された RS エレメント・ターゲティングベクターを構築する。

マウス RS エレメント配列の上流及び下流ゲノム領域の配列は、ある一定以上の塩基数で構成されていればよく、例えばそれぞれ 2 Kb 以上、上流及び下流合わせて 7 Kb 以上の配列で構成されるのが望ましい。

更に、ベクターには RS エレメント配列の位置に選択マーカーが代わりに挿入されるが、例えばネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、プラストサイジン耐性遺伝子、GFP 遺伝子などを用いることが出来る。

更に、ターゲティングベクターの構造に、相同組換えの効率を上げるための改変を施すことができる。すなわち、ゲノム中にターゲティングベクターがランダム挿入された細胞を排除するためのネガティブセレクションマーカーが、ターゲティングベクターが線状化された際にベクターの端部に露出しないように操作することによって、相同組換えの効率を上げることができる。

具体的には、線状化されたターゲティングベクターにおいて、ネガティブセレクションマーカーとして機能する遺伝子構造の 5' 端および 3' 端が、ターゲティングベクターのそれぞれ 5' および 3' 端から少なくとも 1 Kb、好ましくは 2 Kb 以上離れるよう操作することが望ましい。通常、ネガティブセレクションマーカーの 5' 端または 3' 端の一方には、ゲノムとの相同組換えのための領域（相同組換え領域）が位置するため、ベクター端からの距離は 3 Kb 以上となることがほとんどである。一方、ネガティブセレクションマーカーのもう一方の端は、ベクター端に近接している場合が多い。本発明では、ネガティブセレクションマーカーの、相同組換え領域と隣接していない端に、線状化ベクターの末端から少なくとも 1 kb の距離を設けるよう操作し、それにより相同組換えの効率を上昇させる。ベクター端からの距離を確保するための配列としては、ターゲティングベクター

構築の際に使用する pUC などのプラスミドの配列をそのまま残して（すなわち線状化する際に削除しない）利用することもできるし、また、目的とするターゲティング領域に非相同的な任意の新たなノンコーディング配列をネガティブセレクションマーカーの隣に配置することも可能である。ベクターの線状化は、使用しているターゲティングベクターの制限酵素認識部位を精査し、ベクター端とネガティブセレクションマーカーの端とが距離を確保できるような適当な制限酵素部位を選択してベクターを線状化することによって、相同組換え効率を改善させるという効果を達成することができる。また、そのような適当な制限酵素部位が見つからない場合であっても、PCR を用いた手法 (Akiyama ら、Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 16, E77.) により、適当な制限酵素認識配列をターゲティングベクターの所望の位置に導入することができる。

上述したようなターゲティングベクター構造をとることにより、ネガティブセレクションマーカーが細胞中でヌクレアーゼの攻撃を受ける頻度が低下し、相同組換えの効率が上昇するものと考えられる。

すなわち、本発明は、ターゲティングベクターにおいて、ネガティブセレクションマーカーとして機能する遺伝子構造の 5' 端および 3' 端が、線状化したターゲティングベクターのそれぞれ 5' 端および 3' 端から少なくとも 1 Kb、好ましくは 3 Kb 以上離れていることを特徴とする遺伝子ターゲティングベクター、ならびに該ターゲティングベクターを用いた遺伝子ターゲティング方法を提供する。前記ターゲティングベクターにおいて、ネガティブセレクションマーカーとしては公知のものであればいずれのものも利用可能であるが、好ましくはジフテリアトキシン A 遺伝子である。

## （2）RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の取得

マウス ES 細胞は通常以下に記すような方法で樹立することができる。雌雄マウスを交配することにより得られる受精後 2. 5 日の胚を採取し、ES 細胞用培地中でインビトロ培養し、該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離し、そして該胚を、フィーダー細胞培地中に播種して培養し、該培養胚から ES 様形態で生育しているものの細胞塊をトリプシンを含有する ES 細胞用培地を用いて分散処理、及び、フィーダー細胞培地を用いて培養し、更には ES 細胞用培地を用いて継

代培養し増殖する細胞を単離する。

ターゲティングベクターを用いた、RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の取得は、当技術分野で公知の手法、例えば相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング、1995 年、羊土社（日本国）等に記載された方法によって行うことができる。例えば、上記作製したターゲティングベクターを、エレクトロポレーション、リポフェクション法などによりマウス ES 細胞に導入し、RS エレメントを欠失し、かつその領域に耐性遺伝子が挿入されたマウス ES 細胞を取得することが出来る。上記操作によって、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子下流の染色体領域における相同組み換え効率が向上したマウス ES 細胞が取得される。

### （3）ターゲティングベクターの構築

最初に、特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の下流に、所望の蛋白質をコードする核酸配列よりリーダー配列コード領域を除去した配列がプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列およびポリ A シグナル領域をコードする配列と機能的に連結された状態（例えば、カセット形式）で挿入されたターゲティングベクターを構築する。

導入する核酸配列は、分泌タンパク質のリーダー配列検定用のコンピュータープログラムであるシグナル P 等により予測されるリーダーアミノ酸配列と成熟タンパク質産物の境界点から終止コドンまでを含んでいれば cDNA でもイントロンを含むゲノム DNA であってもよく、該核酸配列によってコードされる蛋白質の種類はいかなるものでもよい。本発明で使用される核酸配列は、それによってコードされる蛋白質の高発現・分泌のために使用されてもよいし、該蛋白質の機能を解明するために使用されてもよい。したがって、導入する核酸配列はその塩基配列が特定されるならば、いずれの種類のものでも使用可能である。核酸配列（構造遺伝子）の例としては、哺乳動物、好ましくはヒト、由来の機能性蛋白質をコードする遺伝子、たとえば分泌蛋白質をコードする遺伝子、膜蛋白質をコードする遺伝子、細胞内または核内蛋白質をコードする遺伝子、などが挙げられる。

特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の下流に、所望の蛋白質をコードする核酸配列よりリーダー配列コード領域を除去した配列がプロモー

ター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列およびポリ A シグナル領域をコードする配列と機能的に連結された状態（例えば、カセット形式）で挿入されるように動物のゲノムを改変するために、ターゲティングベクターを準備し、このベクターDNA に所望の蛋白質をコードする核酸配列よりリーダー配列コード領域を除去した配列がプロモーター/5' 非翻訳領域/リーダー配列コード領域からなる配列およびポリ A シグナル領域をコードする配列と機能的に連結された状態（例えば、カセット形式）の核酸配列を挿入する。この目的のために使用可能なベクターの例は、プラスミド、ウイルスなどであり、当業者であればターゲティングベクターとして使用可能なベクターを容易に選択し、入手することができる。ベクターの具体例は、限定するものではないが、pCk-1oxPVKI ベクター（後述の実施例参照）である。ターゲティングベクターは、特定の細胞および/または組織において発現する遺伝子のポリ A シグナル領域の下流に、前記カセットの挿入部位として適当な制限酵素切断部位が配置される。更に、ベクターには、必要に応じて選択マーカー、たとえばピューロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、プラストサイジン耐性遺伝子、GFP 遺伝子等を含むことができる。

#### （4）非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞へのターゲティングベクターの導入、および相同組換え体の選択

ターゲティングベクターによる非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞の形質転換は、当技術分野で公知の手法、例えば相沢慎一（上記）等に記載された方法によって行うことができる。例えば、上記作製したターゲティングベクターを、エレクトロポレーション、リポフェクション法などにより分化多能性を有する細胞に導入することができる。

さらに、ターゲティングベクターの構造に、相同組換えの効率を上げるために改変を施すことができる。すなわち、ゲノム中にターゲティングベクターがランダム挿入された細胞を排除するためのネガティブセレクションマーカーが、ターゲティングベクターが線状化された際にベクターの端部に露出しないように操作することによって、相同組換えの効率を上げることができる。

具体的には、線状化されたターゲティングベクターにおいて、ネガティブセレクションマーカーとして機能する遺伝子構造の 5' 端および 3' 端が、ターゲティ

ングベクターのそれぞれ 5' および 3' 端から少なくとも 1 Kb、好ましくは 2 Kb 以上離れるよう操作することが望ましい。通常、ネガティブセレクションマーカーの 5' 端または 3' 端の一方には、ゲノムとの相同組換えのための領域（相同組換え領域）が位置するため、ベクター端からの距離は 3 Kb 以上となることがほとんどである。一方、ネガティブセレクションマーカーのもう一方の端は、ベクター端に近接している場合が多い。本発明では、ネガティブセレクションマーカーの、相同組換え領域と隣接していない端に、線状化ベクターの末端から少なくとも 1 kb の距離を設けるよう操作し、それにより相同組換えの効率を上昇させる。ベクター端からの距離を確保するための配列としては、ターゲティングベクター構築の際に使用する pUC などのプラスミドの配列をそのまま残して（すなわち線状化する際に削除しない）利用することもできるし、また、目的とするターゲティング領域に非相同的な任意の新たなノンコーディング配列をネガティブセレクションマーカーの隣に配置することも可能である。ベクターの線状化は、使用しているターゲティングベクターの制限酵素認識部位を精査し、ベクター端とネガティブセレクションマーカーの端とが距離を確保できるような適当な制限酵素部位を選択してベクターを線状化することによって、相同組換え効率を改善させという効果を達成することができる。また、そのような適当な制限酵素部位が見つからない場合であっても、PCR を用いた手法 (Akiyama ら、Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 16, E77.) により、適当な制限酵素認識配列をターゲティングベクターの所望の位置に導入することができる。

上述したようなターゲティングベクター構造をとることにより、ネガティブセレクションマーカーが細胞中でヌクレアーゼの攻撃を受ける頻度が低下し、相同組換えの効率が上昇するものと考えられる。

すなわち、本発明は、ターゲティングベクターにおいて、ネガティブセレクションマーカーとして機能する遺伝子構造の 5' 端および 3' 端が、線状化したターゲティングベクターのそれぞれ 5' 端および 3' 端から少なくとも 1 Kb、好ましくは 3 Kb 以上離れていることを特徴とする遺伝子ターゲティングベクター、ならびに該ターゲティングベクターを用いた遺伝子ターゲティング方法を提供する。前記ターゲティングベクターにおいて、ネガティブセレクションマーカーとしては

公知のものであればいずれのものも利用可能であるが、好ましくはジフテリアトキシン A 遺伝子である。

ポジティブセレクションマーカーとしては、本出願人によって出願された PCT 国際出願 WO 00/10383 号パンフレット（2000 年 3 月 2 日国際公開）に記載された pLoxP-Puro 由来のピューロマイシン耐性カセットを用いることができる。この薬剤耐性カセットは、その両端に順方向に Lox-P 配列を含んでいる。よって WO 00/10383 号パンフレットに記載された方法により、同耐性遺伝子をターゲティングベクターが挿入された分化多能性を有する細胞から除去することができる。

さらに、前記 RS 配列を除去する際に用いるポジティブセレクションマーカーとしては、本出願人によって出願された PCT 国際出願 WO 00/10383 号パンフレット（2000 年 3 月 2 日国際公開）に記載された pLoxP-STneo 由来の Neo 耐性カセットを用いることができる。この薬剤耐性カセットは、その両端に順方向に LoxP 配列を含んでいる。よって WO 00/10383 号パンフレットに記載された方法により、同耐性遺伝子をターゲティングベクターが挿入された分化多能性を有する細胞から除去することができる。

さらにまたターゲティングベクターに含まれるポジティブセレクション用薬剤耐性マーカー（例えばピューロマイシン耐性カセット）あるいは RS 配列を除去するため挿入されたポジティブセレクション用薬剤耐性マーカー（例えば Neo 耐性カセット）のいずれかについて、該薬剤耐性カセットの両端に順方向で存在する LoxP 配列として、変異型 LoxP 配列（Lee ら、Gene, 216:55-65, 1998）を用いることができる。この方法により、C<sub>κ</sub> ポリ A 部位直下、ターゲティングベクターに含まれるピューロマイシン耐性カセット両端の LoxP 配列と約 25kb 下流に存在する RS 配列領域に存在する Neo 耐性カセット両端の LoxP 配列間ゲノム配列の組換えによる欠失を防ぐことが可能であり、上記 2 種の薬剤耐性カセットのみを同時に除去したい場合に有用である。

これまでの研究で免疫グロブリン<sub>κ</sub>鎖遺伝子座内のイントロンエンハンサー部位（Xu ら、Immunity, 4:377-385, 1996）、あるいは C<sub>κ</sub> エクソン下流約 9kb の 3' エンハンサー領域（Gorman ら、Immunity, 5:241-252, 1996）に挿入された薬剤耐性カセットが、免疫グロブリン<sub>κ</sub>鎖遺伝子の VDJ 組換えを阻害し、<sub>κ</sub>鎖の発現量

が低下する現象が報告されていた。これらの報告においては、Cre/LoxP システムの利用により、薬剤耐性カセットを除去した結果、いずれの場合もその発現がある程度回復することから、薬剤耐性カセットの存在が  $\kappa$  鎖の発現に影響を与えていたことが示唆されていた。一方、マウス C $\kappa$  領域をヒト C $\kappa$  領域と置換した実験 (Zou ら、Science, 262:1271-1274, 1993) においては、C $\kappa$  下流域に付随する薬剤耐性マーカーの存在に関わらず、高いレベルのマウス/ヒトキメラ Ig $\kappa$  鎖の発現が観察された。すなわち、Ig $\kappa$  近傍領域に挿入された薬剤耐性カセットの存在が、Ig $\kappa$  鎖の発現に与える影響については、結論は得られていないかった。さらに、Ig $\kappa$  の制御領域を利用しているが、内在性 Ig $\kappa$  遺伝子とは独立した発現ユニットに含まれる遺伝子の発現への影響についても良く分かっていない状況であった。

更に、マウス ES 細胞として免疫グロブリン $\kappa$  軽鎖遺伝子の下流約 25Kb の RS エレメント領域に薬剤耐性マーカーが挿入された胚性幹細胞を用いで Ig $\kappa$  定常領域下流に目的とする遺伝子を、ターゲティングベクターを用いて挿入する効率を上げることが出来る。

相同組換え体を簡便に同定するために、外来 DNA がターゲティングされる位置に薬剤耐性遺伝子マーカーをあらかじめ挿入しておくこともできる。例えば、本明細書中実施例で用いられているマウス ES 細胞 TT2F は、C57BL/6 系統と CBA 系統との間の F 1 個体由来の細胞である。先述したように (Deng & Capecchi, Mol. Cell. Biol., 12:3365-71, 1992)、ターゲティングベクターに含まれるゲノム相同領域の配列が C57BL/6 に由来する場合、TT2F 細胞においては C57BL/6 由来のアレルにおいてより高率に相同組換えが起こると想像される。すなわち、あらかじめ C57BL/6 由来ゲノム DNA を含むターゲティングベクターを用いて C57BL/6 由来のアレルに例えば G418 耐性マーカーを挿入することができる。次に得られた G418 耐性株について、ピューロマイシン耐性マーカーを含み、かつ C57BL/6 由来ゲノム DNA を含むターゲティングベクターを導入してピューロマイシン耐性かつ G418 感受性株を取得することができる。この株においては、ターゲティングベクターと、前記特定の細胞および/または組織において発現する遺伝子との相同組換えにより G418 耐性遺伝子が除去され、代わりに所望の蛋白質をコードする核酸配列 (例えば、構造遺伝子など) とピューロマイシン耐性マーカーが挿入されている。

このような方法により、相同組み換え体同定におけるサザン解析等の手間を省くことができる。

本出願人によって出願された PCT 国際出願 WO 00/10383 号パンフレット（2000 年 3 月 2 日国際公開）に記載された方法と同様に、ピューロマイシン耐性クローニングをピックアップし、ゲノム DNA を調製し、サザン解析法により相同組換え体を同定することが可能である。ターゲティングベクター中のピューロマイシン耐性遺伝子は、WO 00/10383 号パンフレットに記載された Lox-P Puro プラスミドに由来し、その両端に順方向に Lox-P 配列を含んでいる。よって WO 00/10383 号パンフレットに記載された方法により、同耐性遺伝子をターゲティングされた分化多能性を有する細胞から除去することができる。

上述したターゲティングベクター、ならびに相同組換え効率を向上させる技術および手段は、遺伝子導入可能な細胞すべてに応用が可能であり、キメラ動物の作製に限定されない。例えば、ヒトおよびヒト細胞（例えば血液細胞や免疫細胞など）を対象とした遺伝子治療において、本明細書に記載のターゲティングベクターおよび相同組換え効率を向上させる技術を所望の遺伝子を破壊または導入するために使用することができる。

## 2. 特定の細胞および／または組織が欠損した宿主胚

本発明のキメラ非ヒト動物の作製方法では、次に、前記特定の細胞および／または組織が欠損した非ヒト動物系統の宿主胚（以下、欠損宿主胚ともいう）を用意する。そのような欠損宿主胚としては、免疫グロブリン軽鎖遺伝子を制御領域として利用する場合には、免疫グロブリン重鎖遺伝子ノックアウトによる B 細胞欠損胚（Tomizuka ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 18:722-727, 2000）、T 細胞受容体遺伝子を制御領域として利用する場合には、T 細胞受容体  $\beta$  鎖欠損による T リンパ球細胞欠損胚（Mombaerts ら、Nature, 360: 225-227, 1992）、ミオグロビン遺伝子を制御領域として利用する場合には、マイオゲニン遺伝子ノックアウトによる筋肉組織の欠損胚（Nabeshima ら、Nature, 364:532-535, 1993）、クリスタリン遺伝子を制御領域として用いる場合には、水晶体を欠損するマウスの突然変異体である aphakia (ak) 系統由来の胚（Liegeois ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93: 1303-1307, 1996）、レニン遺伝子を制御領域として利用する場合には、

Sal11 遺伝子ノックアウトによる腎臓組織の欠損胚 (Nishinakamura ら、Development, 128: 3105-3115, 2001)、アルブミン遺伝子を制御領域として利用する場合には、c-Met 遺伝子欠損による肝臓組織の欠損胚 (Bladt ら、Nature, 376: 768-770, 1995)、リパーゼ遺伝子を制御領域として用いる場合には、Pdx1 遺伝子ノックアウトによる膵臓組織欠損胚 (Jonsson ら、Nature, 371: 606-9, 1994) などが挙げられる。好ましい欠損宿主胚を上記例示したが、本発明で使用可能な欠損宿主胚は上記のものに限定されない。

また、効率的なキメラ非ヒト動物作製を行うための宿主胚の発生時期、遺伝的背景等の選択については、それぞれの ES 細胞株について既に検討された条件を用いることが望ましい。例えばマウスの場合、CBA×C57BL/6 F1 由来の TT2 細胞または TT2F 細胞 (野性色、Yagi ら、Analytical Biochemistry, 214:70-76, 1993) からのキメラ作製については宿主胚が Balb/c (白色、日本国日本クレア社)、ICR (白色、日本国日本クレア社)、または MCH (ICR) (白色、日本国日本クレア社) の遺伝的背景であることが望ましい。よって前記特定の細胞および／または組織が欠損した非ヒト動物系統とこれらの系統の戻し交配により得られる非ヒト動物の胚 (例えば 8 細胞期胚) を欠損宿主胚として用いるのが望ましい。

宿主胚において欠損する細胞および／または組織は、blastocyst stage・コンプレメンテーション (BC) によって、分化多能性を有する細胞により補填されるため、前記宿主欠損胚は、キメラ動物を作製するための胚盤胞期まで発生しうるものであれば、胚性致死のものであってもかまわない。このような胚性致死胚は、遺伝子の欠損がヘテロである動物同士の交配によって原理的には 4 分の 1 の確率で生じるため、交配により得られた胚を複数取得して下記手順に従ってキメラ動物を作製し、その中から宿主胚が欠損胚であるものを選抜する。この選抜は、キメラ動物の体組織より抽出した DNA を用いたサザン解析、PCR 解析等により行うことができる。

### 3. キメラ胚の作製および仮親への移植

上記「1. 分化多能性を有する細胞の作製」の項目で得られた遺伝子導入 (ES) 細胞株からのキメラ非ヒト動物の作製は、相沢慎一 (前記) 等に記載された方法で行うことができる。具体的に説明すると、作製した遺伝子導入分化多能性

細胞を、上記「2. 特定の細胞および／または組織が欠損した宿主胚」の項目に記載の欠損宿主胚の胚胎盤胞または8細胞期胚に毛細管などを用いて注入する。この胚胎盤胞または8細胞期胚を、直接同種の仮親非ヒト動物の卵管に移植するか、一日培養して胚盤胞まで発生したものを該仮親の子宮に移植する。その後、仮親を飼育出産させることにより、仔動物を得る。

#### 4. キメラ非ヒト動物における導入遺伝子の発現

上記「3. キメラ胚の作製および仮親への移植」の項目に従って作製される遺伝子導入分化多能性細胞注入胚に由来する仔動物における分化多能性細胞の貢献率は、その毛色により大まかに判定することができる。例えば、TT2F細胞（野生色）由来の遺伝子導入細胞株をMCH(ICR)（白色）バックグラウンドの宿主マウス胚に注入した場合、野生色（濃茶）の割合が分化多能性細胞の貢献率を示している。ここで毛色における貢献率は、前記欠損する細胞および／または組織以外の細胞および／または組織における遺伝子導入分化多能性細胞の貢献率と相関があるが、組織によっては毛色の貢献率と一致しない場合もある。一方、上記キメラ非ヒト動物においては、宿主胚由来の前記欠損する細胞および／または組織は存在せず、遺伝子導入分化多能性細胞由来のもののみ存在する。遺伝子導入分化多能性細胞の貢献による、キメラ非ヒト動物における欠損細胞および／または組織の回復は、FACS解析（Fluorescence-Activated Cell Sorter）、ELISA法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）等によって検出可能である。遺伝子導入分化多能性細胞由来の細胞および／または組織において挿入した核酸配列（構造遺伝子）が発現するかどうかは、当該細胞および／または組織由来のRNAを用いたRT-PCR法（Kawasakiら、P. N. A. S., 85:5698-5702, 1988）、ノーザンプロット法（Ausubelら、Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994）などにより検出される。蛋白質レベルの発現は、導入した核酸配列がコードする所望の蛋白質に対する特異的抗体が既にある場合は、キメラマウス血清を用いた酵素免疫測定法（ELISA；富山・安東、単クローン抗体実験マニュアル、1987、講談社サイエンティフィク（日本国））、ウエスタンプロット法（Ausubelら、前記）等を利用して検出できる。また、導入される核酸配列（例えば、構造遺伝子）をコードするDNAを適当に改変し、抗体で検出可能なタグペプチドを付

加しておけば、該タグペプチドに対する抗体等で導入した遺伝子の発現を検出できる (POD 標識抗 His<sub>6</sub>、ロシュ・ダイアグノスティックス (日本国))。

上述のようにして作製されたキメラ非ヒト動物は、少なくとも特定の細胞および／または組織において、導入した核酸配列 (例えば、構造遺伝子) が高発現する。発現した所望の蛋白質が、血液、乳などの分泌されるような系であれば、有用蛋白質の生産系として利用することができる。また、機能未知の蛋白質を高発現させた場合には、前記高発現に伴う所見から、当該蛋白質の機能を解明していくことができる。

さらに近年、体細胞核移植胚からの動物個体作製法と体細胞におけるジーン targeting とを組み合わせて、マウス以外の動物種 (ウシ、ヒツジ、ブタ等) でもマウス同様の遺伝子改変が可能になった (McCreath ら、Nature, 405: 1066-1069, 2000)。例えば免疫グロブリン重鎖のノックアウトにより B 細胞を欠損するウシを作製可能である。さらにマウス、ウシ、ヒツジ、ブタなどの Ig 遺伝子あるいはその近傍に導入遺伝子を挿入し、線維芽細胞の核を移植した未受精卵を発生させ、胚盤胞期胚より ES 細胞を調製可能である。この ES 細胞と上記 B 細胞欠損宿主胚との間でキメラ非ヒト動物が作製可能であり (Cibelli ら, Nature Biotechnol., 16: 642-646, 1998)、マウスだけでなくその他の動物種においても同様の発現系を利用した分泌蛋白質の高発現が可能である。大動物の利用により、遺伝子機能解析だけでなく有用物質生産への適用も考えられる。本明細書に記載の方法に従って、マウスあるいはウシ免疫グロブリン遺伝子の制御領域により制御されるべく構築された外来 DNA 発現ユニットを Kuroiwa ら (Nat. Genet. 36:775-80, 2004) に記された方法によってウシ胎児由来線維芽細胞の内在性免疫グロブリン遺伝子座近傍に挿入することができる。得られる遺伝子改変ウシ線維芽細胞から前記 Kuroiwa ら (Nat. Genet. 36:775-80, 2004) に記された方法に従って作製されたクローンウシ個体の血清中には該外来 DNA が高発現することが期待される。

## 5. キメラ非ヒト動物の子孫の作製

本発明のキメラ非ヒト動物の作製方法は、さらに、それと同種の非ヒト動物と交配させて導入した核酸配列をヘテロにもつトランスジェニック (Tg) 動物を選

択して得、この Tg 動物の雄と雌を交配させて導入遺伝子をホモにもつ Tg 動物子孫を得ることを含む。

#### 6. キメラ非ヒト動物またはその子孫に由来する組織または細胞

本発明においては、前記いずれかのキメラ非ヒト動物またはその子孫に由来する組織または細胞を得ることができる。該細胞または組織は、該細胞または組織において発現する遺伝子の制御領域によって所望の蛋白質の発現が制御されるべく該所望の蛋白質をコードする核酸配列をゲノム上に含み、所望の蛋白質を発現することができるものである。

前記組織および細胞には、キメラ非ヒト動物またはその子孫に由来し、かつ所望の蛋白質を発現することができるものであればいずれの組織および細胞も含まれ、例えば、B 細胞、脾臓、リンパ組織などが挙げられる。

前記組織および細胞は、当技術分野で公知の手法により採取・培養することができ、該組織および細胞が所望の蛋白質を発現しているかどうかも慣例的な手法に従って確認することができる。このような組織および細胞は、以下で記載するハイブリドーマの作製、蛋白質の製造などに有用である。

#### 7. ハイブリドーマの作製

本発明においては、導入した所望の蛋白質をコードする核酸配列を発現するキメラ非ヒト動物の細胞、特に B 細胞もしくは B 細胞を含む脾臓、リンパ節などのリンパ組織からの細胞と、増殖可能な腫瘍細胞（たとえばミエローマ細胞）とを融合することによって、ハイブリドーマを得ることができる。ハイブリドーマの作製法は、たとえば安東・千葉（単クローナン抗体実験操作法入門、1991、講談社サイエンティフィク（日本国））に記載される手法に基くことができる。

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることができるが、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば 8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c 由来) ミエローマ株 P3X63Ag8U. 1 (P3-U1) [Yelton, D. E. ら, Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7 (1978)], P3/NS1/1-Ag4-1 (NS-1) [Kohler, G. ら, European J. Immunology, 6:511-519 (1976)], Sp2/0-Ag14 (SP-2) [Shulman, M. ら, Nature, 276:269-270 (1978)], P3X63Ag8. 653 (653) [Kearney,

J. F. ら, J. Immunology, 123:1548-1550 (1979) ]、P3X63Ag8(X63) [Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256:495-497 (1975) ]などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば 8-アザグアニン培地〔グルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシンおよびウシ胎児血清（以下「FCS」という）を加えた RPMI-1640 培地に 8-アザグアニンを加えた培地〕、イスコフ改変ダルベッコ培地（Iscove's Modified Dulbecco's Medium；以下「IMDM」という）、またはダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium；以下「DMEM」という）で継代培養するが、細胞融合の 3～4 日前に正常培地（例えば、10% FCS を含む DMEM 培地）で継代培養し、融合当日に  $2 \times 10^7$  以上の細胞数を確保しておく。

導入した核酸配列がコードする所望の蛋白質を発現する細胞として使用可能なものは、プラズマ細胞（すなわち、形質細胞）、およびその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾臓、リンパ節、骨髓、扁桃、末梢血、またはこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

導入した核酸配列がコードする所望の蛋白質を発現する脾細胞をミエローマと融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単なポリエチレングリコールを用いる方法である。具体的には次のように行うことができる。脾細胞とミエローマとを無血清培地（例えば DMEM）、またはリン酸緩衝生理食塩液（一般に PBS と呼ばれる）でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が通常約 5 : 1 ～ 約 10 : 1 になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、搅拌しながら 1 ml の 50% (w/v) ポリエチレングリコール（分子量 1000～4000）を含む無血清培地を滴下する。その後、10 ml の無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン液およびヒトイントロイキン-6 を含む正常培地（一般に HAT 培地と呼ばれる）中に懸濁して培養用プレートの各ウェルに分注し、5% 炭酸ガス存在下、37°C で 2 週間程度培養する。培養途中に適宜 HAT 培地を補う。

ミエローマ細胞が 8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチ

ン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 欠損株である場合には、融合しなかった該ミエローマ細胞、およびミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT 含有培地中では生存できない。一方、脾臓細胞どうしの融合細胞、あるいは、脾臓細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは生存することができるが、脾臓細胞どうしの融合細胞には寿命がある。従って、HAT 含有培地中での培養を続けることによって、脾臓細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが生き残る。

得られたハイブリドーマは、前記の導入した核酸配列がコードする所望の蛋白質に対して特異的な抗体による ELISA でスクリーニングすることにより、導入した核酸配列がコードする所望の蛋白質を產生するハイブリドーマを選択することができる。

#### 8. 蛋白質の製造方法

本発明はさらに、上記のキメラ非ヒト動物またはその子孫、あるいは上記の組織または細胞、あるいは上記のハイブリドーマのいずれかを用いて所望の蛋白質を產生させた後、該蛋白質を回収することを含む、所望の蛋白質を製造する方法を提供する。具体的に説明すると、キメラ非ヒト動物またはその子孫の個体を、導入した所望の蛋白質をコードする核酸配列が発現しうる条件下で飼育し、その後発現産物である蛋白質を動物の血液、腹水などから回収することができる。あるいはまた、キメラ非ヒト動物またはその子孫に由来する組織または細胞、あるいはそれを不死化したもの（例えば、ミエローマ細胞との融合により不死化したハイブリドーマ）などを、導入した所望の蛋白質をコードする核酸配列が発現しうる条件下で培養し、その後発現産物である蛋白質を培養物、培養上清などから回収することができる。発現産物は、遠心分離などの公知の方法に従って回収することができ、さらに硫安分画、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー（例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなど）、分取薄層クロマトグラフィー、HPLC などの公知の方法の 1 種または複数の組み合わせによって精製することができる。

#### 9. 生体内機能の解析方法

本発明はさらにまた、上記のキメラ非ヒト動物またはその子孫の表現型を、所望の蛋白質をコードする核酸配列を含まない対応の野生型 ES 細胞より作製されたキメラ非ヒト動物などの表現型と比較し、それらの表現型の違いを決定することを含む、所望の蛋白質または所望の蛋白質をコードする遺伝子の生体内機能を解析する方法を提供する。

本方法では、遺伝子導入に対応して生体内に現れる任意の形質を物理化学的方法によって検出し、これによって導入した核酸配列または蛋白質の生体内機能を同定することができる。たとえば、所望の蛋白質をコードする核酸配列を含む ES 細胞より作製されたキメラ非ヒト動物またはその子孫、および前記所望の蛋白質をコードする核酸配列を含まない対応の野生型の ES 細胞より作製されたキメラ非ヒト動物の血液を採取し、血球数測定機によって分析する。測定された白血球、赤血球、血小板などの血中濃度を前記 2 種のキメラ非ヒト動物間で比較することによって、導入した核酸配列によってコードされる該所望の蛋白質の血球系細胞の増殖・分化に対する作用を検討することができる。後述の実施例では、導入した核酸配列としてエリスロポエチン (EPO) をコードする DNA を用いたが、この場合、キメラマウスにおいて顕著な赤血球増加（形質）が観察された。

以下に、本発明の好ましい実施形態として、免疫グロブリン軽鎖遺伝子を利用したシステムを例に挙げて記載する。

免疫グロブリン (Ig) は血清中に分泌される蛋白質の中でも最も大量に生産されるものの一つである。例えばヒトにおいては血清蛋白質の 10~20% を占め、その濃度は 10~100mg/ml に達する。Ig は B 細胞、主にその終末分化型であるプラズマ細胞において多量に生産されるが、Ig 遺伝子座における高い転写活性、mRNA の安定性、蛋白質の分泌生産に特化したプラズマ細胞の機能など、様々な要因がその Ig の高レベルの発現に寄与している。さらに、成体において、B 細胞は骨髓で発生し、成熟すると共に脾臓、小腸パイエル板、リンパ節など全身のリンパ組織に移行することから、B 細胞の Ig 遺伝子の制御領域下で產生された導入遺伝子産物は Ig 同様に血中またはリンパ液中に放出され、全身に速やかに行き渡る。本発明においては、このような高発現をもたらす Ig の発現系を利用して所望の蛋白質をコードする核酸配列（例えば、構造遺伝子）を発現させることに利点を有す

る。

導入遺伝子の効率的な発現のための導入遺伝子挿入箇所は、Ig 軽鎖、好ましくは  $\kappa$  軽鎖が望ましいと考えられる。例えば、マウス免疫グロブリンの 95% は  $\kappa$  軽鎖を含み、その定常領域遺伝子は 1 つしか存在しない。一方で、軽鎖  $\lambda$  は 5 % であり、4 種の異なる遺伝子が存在してそのいずれかが使用される。また、重鎖においても定常領域は  $\mu$ 、 $\gamma$  (4 種)、 $\alpha$  および  $\epsilon$  の計 7 種あり、通常、導入遺伝子の挿入は 1 箇所であることを考慮すると、 $\kappa$  鎖の利用が好ましい。

発現形態としては、機能的な Ig 軽鎖が產生される条件でさらに導入した核酸配列が発現することが望ましい。本発明のキメラ非ヒト動物またはその子孫は、免疫グロブリン軽鎖遺伝子近傍に上記遺伝子のプロモーター部分を含み、さらにその下流に所望の蛋白質をコードする核酸配列（すなわち、導入遺伝子）が配置されてなる遺伝子発現ユニットをゲノム上に含むことが好ましい。免疫グロブリン軽鎖遺伝子近傍に上記遺伝子のプロモーター部分を含み、さらにその下流に所望の蛋白質をコードする核酸配列（すなわち、導入遺伝子）を含むように動物のゲノムを改変するために、ターゲティングベクターを準備し、このベクターDNA に該所望の蛋白質をコードする核酸配列を挿入する。このベクターとしては、C  $\kappa$  P2 ターゲティングベクター（後述の実施例 12 参照）が好ましい。ターゲティングベクターは、免疫グロブリン軽鎖遺伝子近傍に上記遺伝子のプロモーター部分を含み、さらにその下流に所望の蛋白質をコードする核酸配列（例えば、導入遺伝子）を導入する核酸配列の挿入部位として適当な制限酵素切断部位が挿入され、該制限酵素切断部位には導入する核酸配列の開始コドンから終止コドンまでを含む DNA (cDNA、ゲノム DNA) が挿入される。また、好ましくは開始コドンの上流にコザック配列等の翻訳促進配列を配置することができる。さらに、相同組換え体を簡便に同定するために、外来 DNA が挿入される位置に薬剤耐性遺伝子マーカー、好ましくはピューロマイシン耐性遺伝子をあらかじめ挿入しておくこともできる。

更に、マウス ES 細胞として免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子の下流約 25Kb の RS エレメント領域に薬剤耐性マーカーが挿入された胚性幹細胞を用いることで Ig  $\kappa$  定常領域近傍に目的とする遺伝子を、ターゲティングベクターを用いて挿入する効率を上げることが出来る。

ターゲティングベクターによる非ヒト動物 ES 細胞の形質転換は、相沢慎一（前記）等に記載された方法によって行うことができる。本出願人によって出願された PCT 国際出願 WO 00/10383 号パンフレット（2000 年 3 月 2 日国際公開）に記載された方法と同様に、ピューロマイシン耐性クローニングベクターをピックアップし、ゲノム DNA を調製し、サザン解析法により相同組換え体を同定する。ターゲティングベクター中のピューロマイシン耐性遺伝子は WO 00/10383 号パンフレットに記載された Lox-P Puro プラスミドに由来し、その両端に順方向に Lox-P 配列を含んでいる。よって WO 00/10383 号パンフレットに記載された方法で同耐性遺伝子を遺伝子導入された ES 細胞から除去することができる。

本発明において、免疫グロブリン軽鎖遺伝子を利用する場合、ES 細胞注入のための欠損宿主胚としては、WO 00/10383 号パンフレットに記載された免疫グロブリン重鎖遺伝子破壊についてホモである非ヒト動物系統を用いることが好ましい。

作製した遺伝子導入 ES 細胞を、上記欠損宿主胚の胚胎盤胞または 8 細胞期胚に毛細管などを用いて注入する。この胚胎盤胞または 8 細胞期胚を、直接同種の仮親非ヒト動物の卵管に移植するか、一日培養して胚盤胞まで発生したものを該仮親の子宮に移植する。その後、仮親を飼育出産することにより、仔動物を得る。

キメラ非ヒト動物においては、宿主胚由来の成熟 B リンパ球は存在せず、遺伝子導入 ES 細胞由来のもののみ存在する。これは、宿主胚として用いる免疫グロブリン重鎖ノックアウト非ヒト動物は、成熟 B リンパ球（B220 陽性）を欠損し、血中に免疫グロブリンが検出されないことによる（Tomizuka ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-727, 2000）。遺伝子導入 ES 細胞の貢献による、キメラ非ヒト動物における成熟 B リンパ球および抗体産生の回復は、FACS 解析、ELISA 法等によって検出可能である。ターゲティング ES 細胞由来 B 細胞において挿入した核酸配列が発現するかどうかは、挿入したアレル（対立遺伝子ともいう）の Ig 軽鎖遺伝子において、部位特異的組換え反応が起こるかどうかに依存している。すなわち挿入アレルの Ig 軽鎖遺伝子の組換えが成功し、その mRNA が機能的な軽鎖をコードする場合、mRNA 上に同時に存在する挿入核酸配列（例えば、構造遺伝子）も IRES の働きにより蛋白質に翻訳される。さらに、挿入アレルの κ 鎖遺伝子の組換えが失敗し、もう一方のアレルの κ 鎖あるいは λ 鎖が機能的な軽鎖をコードする

場合でも、非機能的な  $\kappa$  鎌および導入核酸配列をコードする mRNA の転写は起こるため、挿入核酸配列由来の蛋白質は発現する。挿入核酸配列の発現が起こらないのは、もう一つのアレルの  $\kappa$  鎌あるいは  $\lambda$  鎌が先に機能的な組換えに成功し、挿入アレルの Ig  $\kappa$  鎌の組換えが対立遺伝子排除の機構によりシャットオフされる場合である。非ヒト動物において B 細胞は胎生 12 日目頃より胎児肝組織に出現するが、出生と共に発生の場は骨髓に移動する。胎児期においては、B 細胞は発生の初期段階、すなわち膜型免疫グロブリン受容体を発現する細胞が主体である。成体と比較して B 細胞自体の数が少ないと考えられる。抗体産生は離乳期（3 週齢）より増加するが、終末分化段階であるプラズマ細胞の増加によるものと想像される。以後、B 細胞は、脾臓、リンパ節、小腸パインエル板などのリンパ組織に移動して抗体および挿入核酸配列を発現する。挿入核酸配列がコードする所望の蛋白質は免疫グロブリン同様、血液やリンパ液中に分泌され、全身に行き渡る。

導入核酸配列の B 細胞における発現は以下のようにして確認される。導入遺伝子による mRNA の発現は例えれば脾臓、末梢血有核細胞など、B 細胞を含む組織や細胞集団由来 RNA を用いた RT-PCR 法、ノーザンプロット法などにより検出される。蛋白質レベルの発現は、導入核酸配列がコードする所望の蛋白質に対する特異的抗体が既にある場合は、キメラマウス血清を用いた酵素免疫測定法、ウエスタンプロット法等を利用して検出できる。また、導入核酸配列をコードする DNA を適当に改変して抗体で検出可能なタグペプチドを付加すれば、該タグペプチドに対する抗体等で導入核酸配列の発現を検出できる。

上述のようにして得られたキメラ非ヒト動物は、効率よくかつ確実に導入した所望の蛋白質をコードする核酸配列を高発現する。この効率の高さは、前述したが、主として以下の点に基づく：

- (1) B リンパ球欠損宿主胚の利用によって、キメラ動物の B リンパ球がキメラ率に関わらず全て ES 細胞に由来する。
- (2) マウス ES 細胞として免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子の下流約 25Kb の RS エレメント領域に薬剤耐性マーカーが挿入された胚性幹細胞を用いることで Ig  $\kappa$  遺

伝子近傍における相同組換え効率が 30%以上の効率で起こる。

(3) 免疫グロブリンの発現系を利用している。

(4) 免疫グロブリンの発現は発生初期には非常に少なく、離乳期以降に爆発的な増加を示すため、高発現が胚性致死をもたらすような遺伝子を導入する場合でも、成体における機能を検討することができる。

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって限定されるものでない。

### 実施例 1

#### pPSs hEPO in vitro 用ベクターの構築

1-1. pBluescriptIISK(-) の SalI-HindIII 間への PacI-FseI-NheI サイト導入・・・・pBS+PFN

pBluescriptIISK(-) (米国 STRATAGENE) を制限酵素 SalI、HindIII (Roche) で消化し、以下の合成オリゴをアニールさせて ligation kit ver. 2 (タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により導入した。それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入して得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシーケンスを行った。

S/PFN/Hd-S : TCGACTTAATTAAGGCCGGCCCTAGCTAGCA (配列番号 1)

S/PFN/Hd-AS : AGCTTGCTAGCTAGGCCGGCCTAATTAAG (配列番号 2)

1-2. プロモーター、シグナル配列の持つ小ベクターの構築・・・・pPSs3.8

GenBank より取得した MUSIGKVR1 (accession K02159) をもとに、その上流のゲノム配列を UCSC マウスゲノムデータベースより取得した。プロモータ領域と、イントロンを含むシグナル配列を増幅する PCR プライマーを設計した。

PsecSP FW1 :

CCTTAATTAAAGTTATGTGTCCTAGAGGGCTGCAAATCAAGATC (配列番号 3、PacI サイト含む)

PsecSP RV :

TTGGCCGGCCTGGCGCCAGTGGAACCTGGAATGATAAACACAAAGATTATTG (配列番号 4、SfoI・FseI 含む)

KOD-plus- (日本国東洋紡) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$  l

反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、MgSO<sub>4</sub> 1.6mM、鑄型としてマウス ES 細胞由来の DNA を添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル增幅し、得られた 0.8Kb の増幅断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片 (PS プロモーター断片) を回収した。回収された PCR 増幅断片を FseI および PacI (NEB) で酵素消化し、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

上記 1-1 の pBS+PFN を FseI および PacI (NEB) 消化した後、反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、上記回収された DNA 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシークエンスを行った。PCR に起因する変異が無いクローンを選択した。

#### 1-3. $\kappa$ 5' intron enhancer 領域 DNA 断片の取得

GenBank (米国 NCBI) より取得したマウス Ig $\kappa$  遺伝子近傍ゲノム DNA 配列より以下の DNA (プライマー) を合成した。

5' enhancerFW Kp :

GGGGTACCAAGCTTTGTGTTGACCCTTCCCTA (配列番号 5、KpnI サイト付加)

5' enhancerRV Xh :

CCGCTCGAGAGCTAACCTACTGTATGGACAGGG (配列番号 6、XhoI サイト付加)

KOD-plus- (日本国東洋紡) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$  l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、鑄型として BAC クローン RP23-435I4 (GenBank Accession Number : AC090291) 由来の DNA を添加し、94°C 3 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 40 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル增幅し、得られた約 0.48kb の増幅断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を KpnI および XhoI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

pBluescriptIISK(-) (米国 STRATAGENE) を KpnI および XhoI 消化し、0.8% ア

ガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記回収されたDNA断片を挿入し、それを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入した。得られた形質転換体よりDNAを調製し、挿入断片のシーケンスを行った。PCRによる変異の無いクローンを選択しKpnIおよびXhoI消化した後、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルからQIAquick Gel Extraction Kit（ドイツQIAGEN）を用い添付文書にしたがって酵素処理断片（5'エンハンサー断片）を回収した。

#### 1-4. $\kappa$ 3' エンハンサー領域 DNA 断片の取得

GenBank（米国NCBI）より取得したマウス Ig $\kappa$  遺伝子近傍ゲノムDNA配列より以下のDNA（プライマー）を合成した。

3' エンハンサーFW Hd :

CCCAAGCTTAGCTCAAACCAGCTTAGGCTACACA（配列番号7、HindIIIサイト付）

3' エンハンサーRV Bm-2 :

CGGGATCCCTAGAACGTGTCTGGGCCCATGAA（配列番号8、BamHIサイト付）

KOD-plus-（日本国東洋紡）を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50 $\mu$ l反応液中に上記2種のプライマー各10pmol、錆型としてBACクローンRP23-435I4（GenBank Accession Number : AC090291）由来のDNAを添加し、94°C3分保温した後、94°C15秒および68°C40秒を1サイクルとして30サイクル増幅し、得られた約0.8kbの増幅断片を0.8%ゲルで分離回収した。回収されたゲルからQIAquick Gel Extraction Kit（ドイツQIAGEN）を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収されたPCR増幅断片をHindIIIおよびBamHIで酵素消化し、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルからQIAquick Gel Extraction Kit（ドイツQIAGEN）を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

pBluescriptIISK(-)（米国STRATAGENE）をHindIIIおよびBamHI消化し、0.8%アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記回収されたDNA断片を挿入し、それを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入した。得られた形質転換体よりDNAを調製し、挿入断片のシーケンスを行った。PCRによる変異の無いクローンを選択しHindIIIおよびBamHI消化した後、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルからQIAquick

Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片 (3' エンハンサー断片) を回収した。

#### 1-5. $\kappa$ polyA 断片の取得

CkP2 KI ベクターを EcoRI 及び HindIII で酵素消化し、約 440bp の断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した後、Blunting high (東洋紡) を用いて末端平滑を行い、 $\kappa$  polyA 断片を取得した。

#### 1-6. $\kappa$ 5' エンハンサーを含むベクターの構築 · · · · pPSsE1

上記 1-2 の pPSs3.8 を XhoI 及び KpnI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したのに、上記 1-3 で回収された 5' イントロンエンハンサー断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分のシーケンスを行った。

#### 1-7. $\kappa$ 5' と 3' エンハンサーを含むベクターの構築 · · · · pPSsE2

上記 1-6 の pPSsE1 を BamHI および HindIII で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したのに、上記 1-4 で回収された 3' エンハンサー断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、連結部分のシーケンスを行った。

#### 1-8. PS 型 in vitro 用ベクターの構築 · · · · pPSs5.5

上記 1-7 の pPSsE2 を HindIII で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後、Blunting high (東洋紡) を用いて末端平滑化を行った。大腸菌 C75 由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したのに、上記 1-5 で回収された  $\kappa$  ポリ A 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分のシーケンスを行って、順方向に挿入されているクローンを選択した。

#### 1-9. ヒト erythropoietin DNA 断片 (シグナル配列無し) の作製

EPO(-SP) FW :

CAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCT (配列番号 9、EPO の SfoI サイトをそのまま利用)

EPO(-SP) RV :

TTGGCCGGCCTCATCTGTCCCCTGTCCTGCAGGCC (配列番号 10、FseI サイト含む)

KOD-plus-(日本国東洋紡)を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10 pmol、鑄型としてヒト EPO cDNA を添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅し、得られた 500bp の増幅断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を SfoI および FseI (NEB) で酵素消化し、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。回収された PCR 增幅断片を SfoI および FseI (NEB) で酵素消化し、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

1-10. pPSs hEPO in vitro 用ベクターの構築 ····· pPSs hEPO

上記 1-8 の pPSs5.5 を SalI および FseI で消化後、大腸菌由来アルカリフィオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、1-9 で作製した DNA 断片を挿入した後、DH5  $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、pPSs hEPO in vitro 用ベクター (図 1) を取得した。

## 実施例 2

pNPs hEPO in vitro 用ベクターの構築

2-1. プロモーター、シグナル配列を持つ小ベクターの構築 ····· pNPs3.7

GenBank より取得した MMU231225 (accession No. AJ231225) をもとに、その上流のゲノム配列を UCSC マウスゲノムデータベースより取得。プロモータ領域と、イントロンを含むシグナル配列を増幅する PCR プライマーを設計した。

P2SP FW1 :

CCTTAATTAAATATTTCCCTCCTCTCCTACCAAGTACCCACTCTT (配列番号 11、PacI サイト含む)

P2SP RV :

TTGGCCGGCCTGGCGCCTCTGGACAGTATGACTAGAAAAAGCAAAATAGAG (配列番号 1 2、  
SfoI・FseI サイト含む)

KOD-plus-(日本国東洋紡)を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$  l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、MgSO<sub>4</sub> 1.6mM、鑄型としてマウス ES 細胞由来の DNA を添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅し、得られた 0.5Kb の増幅断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を FseI および PacI (NEB) で酵素消化し、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

上記 1-1 の pBS+PFN を FseI および PacI (NEB) 消化した後、反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、上記回収された DNA 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、挿入断片のシーケンスを行った。PCR に起因する変異が無いクローンを選択した。

#### 2-2. $\kappa$ 5' エンハンサーを含むベクターの構築 · · · · pNPsE1

上記 1-9 のベクターを XhoI 及び KpnI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリリフォスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記 1-3 で回収された 5' イントロンエンハンサー断片を挿入し、それを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、連結部分のシーケンスを行った。

#### 2-3. $\kappa$ 5' と 3' エンハンサーを含むベクターの構築 · · · · pNPsE2

上記 2-2 の pNPsE1 を BamHI および HindIII で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリリフォスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記 1-4 で回収された 3' エンハンサー断片を挿入し、それを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分のシーケンスを行った。

#### 2-4. NP 型 in vitro 用ベクターの構築 · · · · · pNPs5.4

上記 2-1 の pNPs3.7 を HindIII で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後、Blunting high (東洋紡) を用いて末端平滑化を行った。大腸菌 C75 由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記 1-5 で回収された  $\kappa$  ポリ A 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、連結部分のシーケンスを行って、順方向に挿入されているクローンを選択した。

#### 2-5. pNPs hEPO in vitro 用ベクターの構築

上記 2-4 の pNPs5.4 を SalI および FseI で消化後、大腸菌由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記 1-9 で作製した DNA 断片を挿入した後、DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列の確認して、pNPs hEPO in vitro 用ベクター (図 2) を取得した。

### 実施例 3

#### pCks hEPO in vitro 用ベクターの構築

##### 3-1. P2 プロモーターDNA 断片の取得

CkP2 KI ベクターを HindIII および SalI 酵素消化し、約 210bp の断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した後、Blunting high (東洋紡) を用いて末端平滑化を行った。

##### 3-2. Ck 型 in vitro 用ベクターの構築 · · · · pCks4.9

上記 2-4 の pNPs5.4 を PacI および SfoI で酵素消化し 0.8% アガロースゲルより分離精製した後、Blunting high (東洋紡) を用いて末端平滑化を行った。大腸菌 C75 由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記 3-1 の P2 プロモーター断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、連結部分のシーケンスを行って、順方向に挿入されているクローンを選択した。

##### 3-3. ヒト erythropoietin DNA 断片 (シグナル配列有り) の作製

hEPO-BI FW :

CGGGATCCCGGCCACCATGGGGGTGCACGAATGTCCCTGCCT (配列番号 1-3、BamHI サイト含む)

hEPO-Xh RV :

CCGCTCGAGCGCTATCTGTCCCCGTGCCTGCAGGCC (配列番号 1 4、XhoI サイト含む)

KOD-plus- (日本国東洋紡)を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、MgSO<sub>4</sub> 1.6mM、鑄型としてマウス ES 細胞由来の DNA を添加し、94°C3 分保温した後、94°C15 秒および 68°C1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅し、得られた 0.68Kb の増幅断片を 0.8%ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を BamHI および XhoI (Roche) で酵素消化し、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した後、Blunting high (東洋紡) を用いて末端平滑化を行った。

#### 3-4. pCks hEPO in vitro 用ベクターの構築 · · · · pCks hEPO

上記 3-2 の pCks4.9 を FseI で酵素消化し、0.8%アガロースゲルより分離精製した後、Blunting high (東洋紡) を用いて末端平滑化を行った。大腸菌 C75 由来アルカリフィオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記 3-3 のヒトエリスロポエチン (erythropoietin) DNA 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、連結部分のシーケンスを行って、順方向に挿入されているクローンを選択し、pCks hEPO in vitro 用ベクター (図 3) を取得した。

#### 実施例 4

##### ミエローマ細胞へのベクター導入

37°C、6.5%CO<sub>2</sub> 下で RPMI1640 10%FBS 培地を用いて 4 回から 5 回継代し、1x10<sup>6</sup> 程度まで培養した P3-X63. Ag653 細胞を一度 PBS で Wash したのち、無血清 RPMI1640 培地で 6x10<sup>5</sup>/ml に懸濁して 6well プレートに 1ml ずつ播種した。GeneJammer Transfection Reagent (米国 STRATAGENE) 6ul を無血清 RPMI1640 培地 100ul と混合した後、室温で 5 分インキュベートし、滅菌水で 200ng/ul に調製した pPSs hEPO in vitro 用ベクター、pNPs hEPO in vitro 用ベクター、pCks hEPO in vitro 用

ベクターを 5ul 添加して室温で 10 分インキュベートして複合体を形成させた。トランスフェクション試薬-ベクター複合体を、6 ウエルプレートに播種した細胞に滴下して加え、37°C、6.5%CO<sub>2</sub>下で 4 時間培養した後、RPMI1640、20%FBS を 1.1ml 加えた。24 時間後、RNA 回収のため、培養細胞 1ml を回収した。トランスフェクションから 48 時間後の培養上清を回収し、ヒト EPO ELISA に供した。トランスフェクション用導入試薬として DMRIE-C Reagent (米国 Invitrogen) も同様に用いることが出来た。

#### 実施例 5

##### 導入ヒト EPO 遺伝子の転写レベルの比較

上記実施例 4 で行った、トランスフェクション 24 時間後の培養細胞 1ml を回収し、Isogen (日本国ニッポンジーン) を用いて添付のプロトコールに従い全 RNA を精製した。DNase 処理をした後、RNase を含まない滅菌水に溶解した。50ng の全 RNA を SuperScript III First-Strand Synthesis System (米国 Invitrogen) を用いて添付のプロトコールに従い、逆転写反応を行った。逆転写反応後、以下のプライマーを用いて、hEPO の RT-PCR を行った。

hEPO-RT FW5 : GGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTC (配列番号 1 5)

CkpolyA R2 : CGCTTGTGGGAAGCCTCCAAGACC (配列番号 1 6)

内部標準として、Mouse  $\beta$ -actin RT-PCR Primer Set (日本国東洋紡) を用いて  $\beta$ -actin の RT-PCR を行った。

LA-Taq (日本国タカラバイオ) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、cDNA を添加し、94°C3 分保温した後、94°C15 秒および 68°C1 分を 1 サイクルとして 26、29、32 サイクル増幅し、2 %アガロースゲルにて電気泳動した (図 4)。得られた結果から、ベクター構造が pCks タイプよりも、pNPs や pPSs タイプのほうが転写レベルで発現に有利であることが示された。

#### 実施例 6

##### 培養上清中のヒト EPO 濃度の比較

トランスフェクション48時間後の培養上清を回収し、Quantikine IVD Human EPO Immunoassay (米国 R&D SYSTEMS) を用いて添付のプロトコールに従い、培養上清中のヒトエリスロポエチンを定量した (図5、TableI)。得られた結果はベクター構造が pCks タイプ、pNPs タイプ、pPSs タイプの順番に培養上清中のヒト EPO 分泌量が増加することを示した。また、実施例5の転写レベルの比較実験において pNPs タイプ、pPSs タイプ両者で優位な差が認められなかつたことから、転写後段階の差によって pNPs タイプと pPSs タイプの培養上清中ヒト EPO 濃度の顕著な違いが生じたと考えられた。

## 実施例 7

### マウス RS エレメントターゲティング用ベクター

#### (1) KO 基本ベクターの構築

WO 00/10383 号パンフレット (前掲) に記載された pLoxP-STneo プラスミドを XhoI 消化し、両端に LoxP 配列を持つ Neo 耐性遺伝子 (LoxP-Neo) を取得した。LoxP-Neo の両末端を T4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑化し、LoxP-Neo-B を取得した。

pBluescript II SK(-) (日本国東洋紡) に新たな制限酵素サイトを付加するため以下の DNA を合成した。

LinkA1: TCGAGTCGCGACACCGGCGGGCGCGCCC (配列番号 17)

LinkA2: TCGAGGGCGCGCCGCCGGTGTGCGAC (配列番号 18)

LinkB1: GGCGCTTAATTAAGGCCGGCGTCGACG (配列番号 19)

LinkB2: AATTCGTCGACGGCCGGCTTAATTAAGC (配列番号 20)

pBluescript II SK(-) を制限酵素 SalI および XhoI で処理した反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した。プラスミドに新たな制限酵素サイト NruI、SgrAI および AscI を付加するため、LinkA1 および LinkA2 を合成した。この2つのオリゴ DNA からなるリンカーを制限酵素処理したプラスミドに挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、プラスミド pBlueLA を取得した。

続いて、pBlueLA を制限酵素 NotI および EcoRI で処理した反応液をフェノール

/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した。プラスミドに新たな制限酵素サイト PacI、FseI および SalI を付加するため、LinkB1 および LinkB2 を合成した。この 2 つのオリゴ DNA からなるリンカーを制限酵素処理したプラスミドに挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、プラスミド pBlueLAB を取得した。BlueLAB を EcoRV 消化後、反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、LoxP-Neo-B を挿入した後、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、プラスミド pBlueLAB-LoxP-Neo を取得した。

pMC1DT-A (日本国ライフテックオリエンタル株式会社) を XhoI および SalI 消化後、0.8% アガロースゲルにアプライし、約 1 Kb のバンドを分離回収し、QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって DT-A フラグメントを回収した。

pBlueLAB-LoxP-Neo を XhoI 消化後、反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、DT-A フラグメントを挿入した後、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、K0 基本ベクター pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A を取得した。

## (2) マウス RS エレメント 5' 上流ゲノム領域断片の取得

GenBank (米国 NCBI) より取得したマウス RS エレメント遺伝子近傍ゲノム DNA 配列より以下の DNA (プライマー) を合成した。

RS5' FW3 :

ATAAGAATGCGGCCGCAAAGCTGGTGGTTAACAGACTATCTCGTGAAGTG (配列番号 21)

RS5' RV3 :

ACGCGTCGACTCACAGGTTGGTCCCTCTCTGTGTGGTTGCTGT (配列番号 22)

KOD-plus-(日本国東洋紡) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$  l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10 pmol、鑄型として BAC クローン RP23-435I4 (GenBank Accession Number : AC090291) 由来の DNA を添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 5 分を 1 サイクルとして 33 サイクル増幅し、得られた 5kb の増幅断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収し

た。回収された PCR 増幅断片を NotI および SalI で酵素消化し、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

pBlueLAB を NotI および SalI 消化した後、反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、上記回収された DNA 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシーケンスを行った。PCR に起因する変異が無いクローンを選択し NotI および SalI 消化して得られる 5kb の断片を、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

### (3) マウス RS エレメント 3' 下流ゲノム領域断片の取得

GenBank(米国 NCBI)より取得したマウス RS エレメント遺伝子近傍ゲノム DNA 配列より以下の DNA (プライマー) を合成した。

RS3' FW2 : TTGGCGGCCCTCCCTAGGACTGCAGTTGAGCTCAGATTGA (配列番号 23)

RS3' RV3 : CCGCTCGAGTCTTACTGTCTCAGCAACAATAATAAACAGGGG (配列番号 24)

KOD-plus-(日本国東洋紡)を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、鑄型として BAC クローン RP23-435I4 (GenBank Accession Number : AC090291) 由来の DNA を添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 2 分を 1 サイクルとして 33 サイクル増幅し、得られた 2kb の増幅断片を 0.8%ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を AscI および XhoI で酵素消化し、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

pBlueLAB を AscI および XhoI 消化した後、反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、上記回収された DNA 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシーケンスを行った。PCR に起因する変異が無いクローンを選択し AscI および XhoI 消化して得られる 2kb の断片を、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルか

ら QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

(4) 基本ベクターへのマウス RS エレメント 3' 下流ゲノム領域断片の挿入

pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A を AscI および XhoI で消化後、得られる約 7.6 Kb の DNA 断片を 0.8% アガロースゲルより分離精製したものに、(3) で作製したゲノム断片を挿入した後、大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列の確認を行った。

(5) マウス RS エレメント 3' 下流ゲノム領域断片を持つ K0 基本ベクターへのマウス RS 領域 5' 上流ゲノム領域断片の挿入

(4) で得られたプラスミドを NotI および SalI 消化後、得られる 9.6kb の DNA 断片を 0.8% アガロースゲルより分離精製したものに、(2) で作製したゲノム断片を挿入した後、大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、マウス RS エレメントターゲティング用ベクター pBlueRS-LoxP-Neo-DT-A-3' K0-5' K0 (図 6) を取得した。

## 実施例 8

### Electroporation 用マウス RS エレメントターゲティングベクターの調製

pBlueRS-LoxP-Neo-DT-A-3' K0-5' K0 60  $\mu$ g を、スペルミジン添加 (1 mM pH7.0 米国シグマ) バッファー (日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用 H バッファー) を用い、NotI を用いて 37°C で 5 時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5 容量の 100% エタノール、および 0.1 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、-20°C で 16 時間保存した。NotI で一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70% エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で 70% エタノールを除き、1 時間風乾させた。0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L の DNA 溶液となるように HBS 溶液を加え、1 時間室温で保存し、エレクトロポレーション用マウス RS エレメントターゲティング用ベクター pBlueRS-LoxP-Neo-DT-A-3' K0-5' K0-NotI の調製を行なった。

## 実施例 9

### ゲノムサザン解析用プローブの調製

BAC クローン RP23-435I4 (GenBank Accession Number : AC090291) を用いた塩基配列情報を基に、5' KO の上流域 573mer を含むオリゴ DNA を取得するため以下の DNA を合成した。

RS5' Southern FW1 : CATAACAAACAGATACACACATATAC (配列番号 25)

RS5' Southern RV2 : GTCATTAATGGAAGGAAGCTCTCTA (配列番号 26)

Takara Z Taq (日本国宝酒造) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50 μL 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、鑄型としてクローン番号 RP23-434I の BAC 由来 DNA を添加し、94°C 2 分保温したのち、94°C 30 秒、60°C 20 秒、および 72°C 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル增幅し、得られた 573mer の增幅断片を 0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって 5' 側ゲノムサザン用プローブ、5' KO-プローブを回収した。

BAC クローン RP23-435I4 (GenBank Accession Number : AC090291) を用いた塩基配列情報を基に、3' KO の下流域 600mer を含むオリゴ DNA を取得するため以下の DNA を合成した。

RS3' Southern FW1 : TCTTACTAGAGTTCTCACTAGCTCT (配列番号 27)

RS3' Southern RV2 : GGAACCAAAGAATGAGGAAGCTGTT (配列番号 28)

Takara Z Taq (日本国宝酒造) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50 μL 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10pmol、鑄型としてクローン番号 RP23-434I の BAC 由来 DNA を添加し、94°C 2 分保温したのち、94°C 30 秒、60°C 20 秒、および 72°C 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル增幅し、得られた 600mer の增幅断片を 0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって 3' 側ゲノムサザン用プローブ、3' KO-プローブを回収した。

## 実施例 10

### RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の取得

マウス ES 細胞は通常以下に記すような方法で樹立することができる。雌雄マウスを交配することにより得られる受精後 2.5 日の胚を採取し、ES 細胞用培地中にインビトロ培養し、該培養胚のうち胚盤胞まで発生が進んだ胚を分離し、そして該胚を、フィーダー細胞培地中に播種して培養し、該培養胚から ES 様形態で生育しているものの細胞塊をトリプシンを含有する ES 細胞用培地を用いて分散処理、及び、フィーダー細胞培地を用いて培養し、更には ES 細胞用培地を用いて継代培養し増殖する細胞を単離する。

相同組換えにより、RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の取得のため、実施例 7 において作製した pBlueRS-LoxP-Neo-DT-A-3' KO-5' KO を制限酵素 NotI (日本国宝酒造) で線状化し、確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従ってマウス ES 細胞 TT2F (Yagi ら、Analytical Biochem., 214:70, 1993) へ導入した。

TT2F 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジェン社より購入) を用いた。まず、増殖させた TT2F 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁した。その後、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーチュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量: 960  $\mu$  F、電圧: 240V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。24 時間後に 200  $\mu$  g/ml のネオマイシン (米国シグマ) を含む ES 培地と置き換えた。7 日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらネオマイシン耐性 TT2F 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、0.8% アガロースゲ

ル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、ターゲティングベクター 3' 相同領域の下流に位置する DNA 断片 (3' KO-プローブ、実施例 9 参照) をプローブとして相同組換え体を検出した。野生型 TT2F 細胞では EcoRI 消化により、1 本のバンド (約 5.7 Kb) が検出された。相同組換え体においては、2 本のバンド (約 5.7Kb と約 7.4Kb) が検出されることが予想されたが、ネオマイシン耐性株において約 7.4Kb の新たなバンドが確認された (図 7)。更に、3' KO-プローブによるサザン解析で相同組換えが確認されたクローンのゲノム DNA を制限酵素 PstI (日本国宝酒造) で消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、ターゲティングベクター 5' 相同領域の上流に位置する DNA 断片 (5' KO-プローブ、実施例 9 参照) をプローブとして相同組換え体を検出した。野生型 TT2F 細胞では PstI 消化により、1 本のバンド (約 6.1 Kb) が検出された。相同組換え体においては、2 本のバンド (約 6.7Kb と約 6.1Kb) が検出されることが予想されたが、ネオマイシン耐性株において約 6.7Kb の新たなバンドが確認された (図 7)。すなわち、これらのクローンはマウス RS エレメントを含む近傍染色体領域を欠失し、代わりにネオマイシン耐性遺伝子 (両端にはターゲティングベクター由来の制限酵素サイト部位を含む) が挿入されたものである。3' および 5' KO-プローブによるサザン解析の結果、pBlueRS-LoxP-Neo-DT-A-3' KO-5' KO を制限酵素 NotI で線状化した場合には 72 株中 9 株 (12.5%) が相同組換え体であるという結果を得た。

取得された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の核型解析を記載 (相沢慎一、前記) の方法に従い実施し、取得された ES 細胞に異常核型が検出されないことを確認した。

## 実施例 1 1

RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス 系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, Nature, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚

を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的なBリンパ球は、大部分が注入したES細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトマウスについてMCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を3回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例10で得られたピュローマイシン耐性マウスES細胞株 (#32) を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン $\mu$ 鎖ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた8細胞期胚に、それぞれ胚1つあたり8~10個注入した。ES培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約10個のインジェクション胚を移植した。実施例10の#32を用いて作製されたインジェクション胚を計480個移植した結果、80匹の子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中にES細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した80匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわちES細胞の貢献の認められる個体は48匹であった。下記実施例32で行われたヒトEPO遺伝子転写レベルの比較実験、下記実施例33で行われた血清中のEPO濃度比較実験及び下記実施例34で行われた末梢血液の血球解析実験において、実施例11で得られたキメラマウスはコントロール個体として用いられた。

## 実施例12

### pC $\kappa$ P2 KIベクターの作製

#### (1) クローニング部位近傍断片の作製

マウス免疫グロブリンカッパ鎖 (Ig $\kappa$ ) 定常領域遺伝子下流にマウス免疫グロブリン $\kappa$ 鎖プロモーター (P2プロモーター)、制限酵素認識配列 (SalI, FseI, NheI認識配列)、マウス免疫グロブリン $\kappa$ 鎖ポリAシグナル領域およびピュロマイシン耐性遺伝子発現ユニットが上に記載された順番に導入されたゲノム断片を作製

した。以下にその方法を具体的に記す。

(1.1) クローニング部位上流の断片の調製

GenBank (米国 NCBI) より取得したマウス IgG $\kappa$  遺伝子配列より以下の DNA を合成した。

igkcl : atctcgaggaaccactttcctgaggacacagtgatagg (配列番号 29)

igkc2 : atgaattcctaacaactcattcctgttgaagctttgac (配列番号 30)

5' 側プライマーである igkcl の末端には XhoI 認識配列を、3' 側プライマーである igkc2 には EcoRI 認識配列を付加した。TakaLa LA-Taq (日本国宝酒造) の添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ L 反応液中にプライマー各 10pmol および鑄型として Ig 軽鎖 C $\kappa$ -J $\kappa$  を含む  $\lambda$  クローン由来 DNA 断片を pBluescript SKII(+) (日本国東洋紡) クローニングしたもの (WO 00/10383 号パンフレット) 25ng を添加し、94°Cで 1 分保温したのち、94°C 30 秒および 68°C 3 分を 1 サイクルとして 25 サイクル増幅した。得られた反応液をフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した後、EcoRI および XhoI で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて目的の断片を回収して増幅断片 A を得た。EcoRI および XhoI で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pBluescript2 KS-ベクター (米国ストラタジーン) に該増幅断片 A を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、塩基配列を確認し、プラスミド pIgC $\kappa$  A を取得した。

(1.2) クローニング部位下流の断片の調製

GenBank (米国 NCBI) より取得したマウス IgG $\kappa$  遺伝子配列より以下の DNA を合成した。

igkc3 : atgaattcagacaaaggcctgagacgccacc (配列番号 31)

igkc4 : atggatcctcgagtcgactggattcagggcaactaaacatt (配列番号 32)

5' 側プライマーである igkc3 の末端には EcoRI 認識配列を、3' 側プライマーである igkc4 にはプライマーの 5' 側から BamHI、XhoI および SalI 認識配列を付加した。TakaLa LA-Taq (日本国宝酒造) の添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ L 反応液中にプライマー各 10pmol および鑄型として Ig 軽鎖 C $\kappa$ -J $\kappa$  を含む  $\lambda$

クローン由来 DNA 断片を pBluescript SKII(+) (日本国東洋紡) クローニングしたもの (WO 00/10383 号パンフレット) 25ng を添加し、94°Cで 1 分保温したのち、94°C 30 秒、55°C 30 秒および 72°C 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル増幅した。得られた反応液をフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿した後、EcoRI および BamHI で消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて目的の断片を回収して増幅断片 B を得た。EcoRI および BamHI で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pIgC $\kappa$  A ベクターに得られた増幅断片 B を挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、塩基配列を確認し、プラスミド pIgC $\kappa$  AB を取得した。

#### (2) ピューロマイシン耐性遺伝子の導入

Lox-P Puro プラスミド (WO 00/10383 号パンフレット) を EcoRI および XhoI で消化し、T4DNA ポリメラーゼを用いて末端を平滑化した。0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて loxP-ピューロマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片を回収した。pIgC $\kappa$  AB を SalI で消化して末端平滑化したプラスミドに、得られた loxP-ピューロマイシン耐性遺伝子断片を挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認し、プラスミド pIgC $\kappa$  ABP を取得した。

#### (3) IRES 遺伝子の導入

GenBank (米国 NCBI) より取得した *encephalomyocarditis virus* (脳心筋炎ウイルス) 由来の IRES 遺伝子配列より以下の DNA を合成した。

eIRESFW : atgaattcgccctctccctccccccctta (配列番号 3 3)

esIRESRV : atgaattcgctgacttgtggcaagcttatcatcgtgtt (配列番号 3 4)

5' 側プライマーである eIRESFW の末端には EcoRI 認識配列を、3' 側プライマーである esIRESRV にはプライマーの 5' 側から EcoRI および SalI 認識配列を附加した。TakaLa LA-Taq (日本国宝酒造) の添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ L 反応液中にプライマー各 10pmol および鑄型として pIREShyg プラスミド (米国 クロンティック) 150ng を添加し、94°Cで 1 分保温したのち、94°C 30 秒、55°C 30 秒および 72°C 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル増幅した。得られた反応液を

0.8%アガロースゲル電気泳動にかけてDNA断片を分離し、ジーンクリーンII(米国Bio101)を用いて目的の断片を回収した。pGEM-Tベクター(米国プロメガ)に得られたDNA断片を挿入し、大腸菌DH5 $\alpha$ に導入した。得られた形質転換体よりDNAを調製し、塩基配列を確認し、プラスミドIRES-Sal1/pGEMを取得した。このプラスミドをEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にてDNA断片を分離し、ジーンクリーンII(米国Bio101)を用いて目的の断片を回収した。pIgC $\kappa$ ABPをEcoRIで消化したプラスミドに、得られたIRES遺伝子を挿入し、大腸菌DH5 $\alpha$ に導入した。得られた形質転換体よりDNAを調製し、連結部分の塩基配列を確認し、プラスミドpIgC $\kappa$ ABPIRESを取得した。

#### (4) p $\Delta$ C $\kappa$ Sal1プラスミドの作製

WO 00/10383号パンフレットに記載されている免疫グロブリン遺伝子軽鎖 $\kappa$ ターゲティング用ターゲティングベクタープラスミドをSacIIで消化した後、EcoRIを用いて部分消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動にてLoxP-PGKPuro部分を切り出した残りの14.6KbのDNAを分離し、ジーンクリーンII(米国Bio101)を用いて回収した。得られたDNAに以下の合成DNAを挿入することにより、SalI認識配列を導入した。

SalIplus : agtcgaca (配列番号35)

SalIminus : aatttgcgactgc (配列番号36)

得られたプラスミドを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、得られた形質転換体よりDNAを調製し、プラスミドp $\Delta$ C $\kappa$ Sal1を取得した。

#### (5) pKI $\kappa$ プラスミドの作製

上記(3)で得られたpIgC $\kappa$ ABPIRESプラスミドをXhoIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にてDNA断片を分離し、ジーンクリーンII(米国Bio101)を用いてC $\kappa$ -IRES-LoxP-ピューロマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を回収した。上記(4)で作製されたp $\Delta$ C $\kappa$ Sal1をSalIで消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、前記DNA断片を挿入し、それを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入した。得られた形質転換体よりDNAを調製し、連結部分の塩基配列を確認して、プラスミドpKI $\kappa$ を取得した。

#### (6) pIgC $\kappa$ ΔIRES断片の作製

上記（3）で得られた pIgC  $\kappa$  ABPIRES プラスミドを EcoRI と Bg1II で部分消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II（米国 Bio101）を用いて IRES 部分を削除した DNA 断片（pIgC  $\kappa$   $\Delta$  IRES 断片）を回収した。

#### （7）P 2 プロモーター断片の調製

GenBank（米国 NCBI）より取得したマウス Ig  $\kappa$  プロモーター領域遺伝子配列より以下の DNA を合成した。

P2F : CCCAAGCTTGGTATTATTAGAGTAGTTAGATGAGTGCAT（配列番号 37）

P2R : ACGCGTCGACTTGTCTTGAACCTTGGTCCCTAGCTAATTACTA（配列番号 38）

5' 側プライマーである P2F には Hind III 認識配列を、3' 側プライマーである P2R には SalI 認識配列を付加した。マウスゲノム DNA を鑄型として、KOD plus（日本国東洋紡）により増幅された DNA 断片をフェノールクロロフォルム抽出後、エタノール沈殿で回収した。回収された DNA 断片を Hind III および SalI で消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II（米国 Bio101）を用いて回収した。Hind III および SalI で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pBluescript IIKS-ベクター（米国 Stratagene 社）に回収された増幅断片を挿入し、大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、塩基配列を確認し、Ig  $\kappa$  プロモーター領域遺伝子配列を含むプラスミドを取得した。得られたプラスミドを Hind III および SalI で消化した後、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II（米国 Bio101）を用いて P 2 プロモーター断片を回収した。

#### （8）部分長 C $\kappa$ polyA 断片の作製

GenBank（米国 NCBI）より取得したマウス IgC  $\kappa$  polyA 領域遺伝子配列より以下の DNA を合成した。

PPF:

ACCGCGTCGACGCCGGCCGCGCTAGCAGACAAAGGTCTGAGACGCCACCACAGCTCCCC（配列番号 39）

PPR :

GAAGATCTCAAGTGCAAAGACTCACTTATTGAATATTTCTG（配列番号 40）

5' 側プライマーである PPF には SalI, FseI, NheI 認識配列を、3' 側プライマーである PPR には BglII 認識配列を附加した。マウスゲノム DNA を鑄型として、KOD plus (日本国東洋紡) により増幅された DNA 断片をフェノールクロロフォルム抽出後、エタノール沈殿で回収した。回収された DNA 断片を SalI および BglII で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて回収した。SalI および BglII で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pSP72 ベクター (米国 Promega 社) に回収された増幅断片を挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、塩基配列を確認し、部分長 C $\kappa$  polyA 領域遺伝子配列を含むプラスミドを取得した。得られたプラスミドを SalI および BglII で消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて部分長 C $\kappa$  polyA 断片を回収した。

#### (9) 完全長 C $\kappa$ polyA 断片の作製

GenBank (米国 NCBI) より取得したマウス IgC $\kappa$  polyA 領域遺伝子配列より以下の DNA を合成した。

TPF: GGAATTCAAGACAAAGGTCTGAGACGCCACCAGCTCCCC (配列番号 4 1)

TPR: CCCAAGCTTGCCTCCTCAAACCTACCATGGCCCAGAGAAATAAG (配列番号 4 2)

5' 側プライマーである TPF には EcoRI 認識配列を、3' 側プライマーである TPR には HindIII 認識配列を附加した。マウスゲノム DNA を鑄型として、KOD plus (日本国東洋紡) により増幅された DNA 断片をフェノールクロロフォルム抽出後、エタノール沈殿で回収した。回収された DNA 断片を EcoRI および HindIII で消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて回収した。EcoRI および HindIII で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pBluescript II KS-ベクター (米国 Stratagene 社) に回収された増幅断片を挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、塩基配列を確認し、完全長 C $\kappa$  ポリ A 領域遺伝子配列を含むプラスミドを取得した。得られたプラスミドを EcoRI および HindIII で消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて完全長 C $\kappa$  ポリ A 断片を回収した。

(10) 完全長  $C\kappa$  ポリ A 断片、P2 プロモーター断片、部分長  $C\kappa$  ポリ A 断片から構成される DNA 断片 A の作製

EcoRI および BgIII で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pBluescript IIKS-ベクター（米国 Stratagene 社）に完全長  $C\kappa$  polyA 断片、P2 プロモーター断片、部分長  $C\kappa$  polyA 断片を挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、完全長  $C\kappa$  polyA 断片、P2 プロモーター断片、部分長  $C\kappa$  polyA 断片の順番に DNA 断片が挿入されていることを塩基配列のレベルで確認し、DNA 断片 A 遺伝子配列を含むプラスミドを取得した。得られたプラスミドを EcoRI と BgIII で消化した後、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II（米国 Bio101）を用いて DNA 断片 A を回収した。

(11) pIgC $\kappa$  Δ IRES ProA プラスミドの作製

大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pIgC $\kappa$  Δ IRES 断片に DNA 断片 A を挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、DNA 断片 A が挿入されていることを塩基配列のレベルで確認し、DNA 断片 A 遺伝子配列を含む pIgC $\kappa$  Δ IRES ProA プラスミドを取得した。

(12)  $C\kappa$  P2H プラスミドの作製

pIgC $\kappa$  Δ IRES ProA プラスミドを XhoI で消化した後、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II（米国 Bio101）を用いて IgC $\kappa$  上流ゲノム領域、IgC $\kappa$ 、DNA 断片 A、Lox-P Puro 断片より構成される DNA 断片を回収した。SalI で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pΔC $\kappa$  SalI に回収した DNA 断片を挿入し、大腸菌 XL10-GOLD（米国 Stratagene 社）に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、IgC $\kappa$  上流ゲノム領域、IgC $\kappa$ 、DNA 断片 A、Lox-P Puro 断片より構成される DNA 断片が挿入されていることを塩基配列のレベルで確認し、 $C\kappa$  P2H プラスミドを取得した。

(13)  $C\kappa$  5' genomic プラスミドの作製

GenBank（米国 NCBI）より取得したマウス IgC $\kappa$  及び上流ゲノム領域遺伝子配列より以下の DNA を合成した。

ATAAGAATGCGGCCGCTCAGAGCAAATGGGTTCTACAGGCCTAACAAACCT (配列番号 4 3)

5GR:

CCGGAATTCTAACACTCATTCCCTGTTGAAGCTCTGACAATGG (配列番号 4 4)

5' 側プライマーである 5GF には NotI 認識配列を、3' 側プライマーである 5GR には EcoRI 認識配列を付加した。マウスゲノム DNA を鑄型として、KOD plus (日本国東洋紡) により増幅された DNA 断片をエタノールクロロフォルム抽出後、エタノール沈殿で回収した。回収された DNA 断片を NotI および EcoRI で消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて回収した。NotI および EcoRI で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した pBluescript IIKS-ベクター (米国 Stratagene 社) に回収された増幅断片を挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、塩基配列を確認し、C $\kappa$  5' ゲノム領域遺伝子配列を含む C $\kappa$  5' ゲノムプラスミドを取得した。

#### (1 4) C $\kappa$ P2KI $\Delta$ DT プラスミドの作製

C $\kappa$  P2H プラスミドを EcoRI および XhoI で消化した後、0.8% アガロースゲル電気泳動にて 11Kb の DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて 5' 末端に EcoRI サイトを 3' 末端に XhoI サイトを持つ DNA 断片を回収した。EcoRI および XhoI で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した C $\kappa$  5' ゲノムプラスミドに回収した DNA 断片を挿入し、大腸菌 XL10-GOLD (米国 Stratagene 社) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、回収された断片が C $\kappa$  5' ゲノムプラスミドに挿入されていることを塩基配列のレベルで確認し、C $\kappa$  P2KI  $\Delta$  DT プラスミドを取得した。

#### (1 5) DT-A 断片の調製

pKI $\kappa$  プラスミドを XhoI および KpnI で消化した後、0.8% アガロースゲル電気泳動にて約 1Kb の DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II (米国 Bio101) を用いて DT-A 断片を取得した。

#### (1 6) pC $\kappa$ P2 KI ベクターの作製

XhoI および KpnI で消化した後、大腸菌アルカリホスファターゼを用いて末端脱リン酸化した C $\kappa$  P2KI  $\Delta$  DT プラスミドに DT-A 断片を挿入し、大腸菌 XL10-GOLD

(米国 Stratagene 社) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、DT-A 断片が C $\kappa$  P2KI $\Delta$ DT プラスミドに挿入されていることを塩基配列のレベルで確認し、pC $\kappa$  P2 KI ベクター (図 8) を取得した。

### 実施例 1 3

#### pC $\kappa$ P2 KI ベクターへのヒト EPO 遺伝子の挿入

##### (6.1) ヒト Erythropoietin DNA 断片の作製

hEPO Np : CCGCTCGAGCGGCCACCATGGGGTGCACGAATGTCCTG (配列番号 4 5)

hEPO Rp : CCGCTCGAGCGGTACATCTGTCCTGTCCTGCA (配列番号 4 6)

KOD-plus- (日本国東洋紡) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$ l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10 pmol、鑄型としてヒト EPO cDNA を添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅し、得られた 580bp の増幅断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を XhoI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

pBluescriptIISK(-) (米国 STRATAGENE) を XhoI 消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リソ酸化したものに、上記回収された DNA 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシーケンスを行った。PCR による変異の無いクローンを選択し XhoI 消化した後、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがってヒトエリスロポエチン DNA 断片を回収した。

##### (6.2) pC $\kappa$ P2 hEPO KI ベクターの構築

pC $\kappa$  P2 KI ベクターを SalI で消化後、仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リソ酸化したものに、(6.1) で作製したヒトエリスロポエチン DNA 断片を挿入した後、大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE)

に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、pCkP2 hEPO KI ベクター（図 9）を取得した。

#### 実施例 1 4

##### エレクトロポレーション用 pCkP2 hEPO KI ベクターの調製

pCkP2 hEPO KI ベクター 60  $\mu$ g を、スペルミジン添加（1 mM pH7.0 米国シグマ）バッファー（日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用 H バッファー）を用い、NotI を用いて 37°C で 5 時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5 容量の 100% エタノール、および 0.1 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、-20°C で 16 時間保存した。NotI で一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70% エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で 70% エタノールを除き、1 時間風乾させた。0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L の DNA 溶液となるように HBS 溶液を加え、1 時間室温で保存し、エレクトロポレーション用 pCkP2 hEPO KI ベクターの調製を行なった。

#### 実施例 1 5

##### pCkP2 hEPO KI ベクターと RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株を用いた CkP2 hEPO マウス ES 細胞株の取得

ヒト EPO-cDNA が相同組換えにより免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子下流に挿入されたマウス ES 細胞株取得のため、実施例 13 で作製した pCkP2 hEPO KI ベクターを制限酵素 NotI（日本国宝酒造）で線状化し、確立されている方法（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国）に従って RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞へ導入した。

RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法（相沢慎一、前記）に従い、栄養細胞はマイトイマイシン C（米国シグマ）処理した G418 耐性初代培養細胞（日本国インビトロジエン社より購入）を用いた。まず、増殖させた RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞をトリプシン処理し、3  $\times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁してから、0.5 ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット（電極距離：0.4 cm、米国バイオラッド）にてエレクトロポレーションを行った（容量：960  $\mu$ F、電圧：250V、室

温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。36 時間後に 0.8 μg/ml のピューロマイシン (米国シグマ) を含む ES 培地と置き換えた。7 日後に生じたコロニーのうち計 24 個をピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS + 10% DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらのピューロマイシン耐性 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンブロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XhoI~EcoRI、約 1.4kb、図 5) をプローブとして相同組換え体を検出した。その結果、24 株中 15 株 (62.5%) が相同組換え体であるという結果を得た。野生型 TT2F 細胞では EcoRI 消化により、1 本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される (図 10) が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認された。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されたものである。

### 実施例 16

CkP2 hEPO マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, Nature, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。

本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 1 5 で得られ、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された CkP2 hEP0 マウス ES 細胞株 (#57, 69) を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン $\mu$ 鎖ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8 ~ 10 個注入した。ES 培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 1 5 の #57, 69 を用いて作製されたインジェクション胚をそれぞれ計 100 個移植した結果、23 匹、36 匹それぞれ子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中に ES 細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した 23 匹、36 匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体はそれぞれ 15 匹、29 匹であった。これらの結果より、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている Ck EP0 マウス ES 細胞株 #57, 69 はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示された。

### 実施例 1 7

#### pNP hEP0 KI ベクターの構築

1. 上記実施例 1 2 の pCkP2 KI ベクターに一本鎖化サイト AscI を加えたベクター作製 . . . pCkP2+As KI

以下の合成オリゴをアニールさせて、AscI リンカーを合成した。

AscI top linker : GGCCAGGCGCGCCTTGC (配列番号 4 7)

AscI bottom linker : GGCCGCAAGGCGCCCT (配列番号 4 8)

pCkP2 KI ベクターを制限酵素 NotI (Roche) で消化し、0.8%アガロースゲルより分離精製した後に ligation kit ver. 2 (タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により AscI リンカーを導入した。それを大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入して得られた形質転換体より DNA を調製し、挿入断片の塩基配列を確認した。

2. pBlueLAB の PacI・FseI 間に NheI サイト導入・・・・・pBlueLAB+Nh の構築  
pBlueLAB を制限酵素 PacI (NEB) で消化後、核酸精製用マイクロスピンカラム S-200HR (アマシャム) を用いてバッファー置換し、続いて制限酵素 FseI (NEB) で消化。0.8%アガロースゲルより分離精製した後に以下の合成オリゴをアニールさせて、ligation kit ver. 2 (日本国タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により導入した。それを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入して得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシーケンスを行った。

Pac-Nhe-Fse S : TAAGGGCTAGCTAGGGCCGG (配列番号 49)

Pac-Nhe-Fse AS : CCCTAGCTAGCCCTTAAT (配列番号 50)

3. pBlueLAB+Nh の SalI-HindIII 間に HpaI サイト導入・・・・・pBlueLAB+NhHp の構築

pBlueLAB+Nh を制限酵素 SalI、HindIII (Roche) で消化し、0.8%アガロースゲルより分離精製した後に以下の合成オリゴをアニールさせて、ligation kit ver. 2 (日本国タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により導入した。それを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入して得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシーケンスを行った。

S/HpaI/Hd-S : TCGAGTTAAC (配列番号 51)

S/HpaI/Hd-AS : AGCTGTTAAC (配列番号 52)

4. pCkP2+As KI より Ck-polyA を含む P2 プロモーター部分除いたベクター・・・・・pCkpAP2 の構築

pCkP2+As KI を制限酵素 HpaI-NheI (Roche) で消化して生じる 952bp の断片を 0.8%アガロースゲルより分離精製し回収した。pBlueLAB+NhHp を制限酵素 HpaI および NheI (Roche) 消化し、0.8%アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリリフォスファターゼ (日本国タカラバイオ) を用いて末端脱リン酸

化した。上記 952bp の断片を ligation kit ver. 2 (日本国タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により導入した。それを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入して得られた形質転換体より DNA を調整し、連結部分のシーケンスを行った。

5. P2 プロモーターを除去してマルチクローニングサイト (SalI、FseI、PacI) を導入したベクター・・・ p CkpAMCS

上記 4 の pCkpAP2 を制限酵素 HindIII、NheI (Roche) 消化。0.8% アガロースゲルより約 4kb の断片を回収した。以下の合成オリゴをアニールさせて、ligation kit ver. 2 (日本国タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により導入した。

SPFNlinker-S : AGCTGTCGACTTAATTAAGGCCGGCCG (配列番号 5 3)

SPFNlinker-AS : CTAGCGGCCGGCCTTAATTAAGTCGAC (配列番号 5 4)

6. KI 大ベクターの構築・・・ p CkP2  $\Delta$  P

上記 5 の pCkpAMCS を制限酵素 HpaI、NheI (Roche) で消化し、0.8% アガロースゲルより Ck-polyA-MCS を含む約 700bp 断片を回収した。pCkP2+As KI を制限酵素 HpaI-NheI (Roche) で消化し、19.6kb を 0.8% アガロースゲルより回収した後、大腸菌由来アルカリフィオスファターゼ (日本国タカラバイオ) を用いて末端脱リン酸化した。前述の約 700bp 断片を ligation kit ver. 2 (日本国タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により導入した。それを大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入して得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認した。

7. pNP hEPO KI ベクターの構築

上記実施例 2 の pNPsEPO in vitro 用ベクターを SalI 及び FseI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより約 1.2kb の断片を分離精製した後、上記 6 の p CkP2  $\Delta$  P を SalI および FseI で酵素消化後、大腸菌 C75 由来アルカリフィオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したのに挿入。それを大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、pNP hEPO KI ベクター(図 1 1)を取得した。

## 実施例 1 8

### エレクトロポレーション用 pNP hEPO KI ベクターの調製

pNP hEPO KI ベクター $60\mu\text{g}$ を、スペルミジン添加 (1 mM pH7.0 米国シグマ) バッファー (日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用Hバッファー) を用い、NotI を用いて 37°Cで 5 時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5 容量の 100%エタノール、および 0.1 容量の 3M 酢酸ナトリウムを加え、-20°C で 16 時間保存した。NotI で一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70%エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で 70%エタノールを除き、1 時間風乾させた。0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の DNA 溶液となるように HBS 溶液を加え、1 時間室温で保存し、エレクトロポレーション用 pNP hEPO KI ベクターの調製を行なった。

### 実施例 1 9

pNP hEPO KI ベクターと RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株を用いた NP hEPO マウス ES 細胞株の取得

ヒト EPO-cDNA が相同組換えにより免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子下流に挿入されたマウス ES 細胞株取得のため、実施例 1 8 で作製した pNP hEPO KI ベクターを制限酵素 NotI (日本国宝酒造) で線状化し、確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞へ導入した。

RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイマイシンC (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジョン社より購入) を用いた。まず、増殖させた RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ $\text{ml}$  となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を  $10\mu\text{g}$  のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量:  $960\mu\text{F}$ 、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。36 時間後に  $0.8\mu\text{g}/\text{ml}$  のピューロマイシン (米国シグマ) を含む ES 培地と置き換えた。7 日後に生じたコロニーのうち計 24 個をピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエン

トになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°Cにて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6\sim10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらのピューロマイシン耐性 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XhoI~EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット、特に図 25) をプローブとして相同組換え体を検出した。その結果、24 株中 11 株 (45.8%) が相同組換え体であるという結果を得た。野生型 TT2F 細胞では EcoRI 消化により、1 本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される (図 12) が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認された。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されたものである。

## 実施例 20

NP hEPO マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が產生されない (Kitamura ら、Nature, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 19 で得られ、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿

入されていることが確認された NP hEPO マウス ES 細胞株 (#10) を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン $\mu$ 鎖ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8 ~ 10 個注入した。ES 培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 1 9 の #10 を用いて作製されたインジェクション胚をそれぞれ計 100 個移植した結果、18 匹それぞれ子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中に ES 細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した 23 匹、36 匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体は 13 匹であった。これらの結果より、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている NP hEPO マウス ES 細胞株 #10 はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示された。

## 実施例 2 1

### pPS hEPO KI ベクターの構築

上記実施例 1 の pPSs hEPO *in vitro* 用ベクターを SalI 及び FseI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより約 1.3kb の断片を分離精製した後、上記実施例 1 7 の pCkP2 $\Delta$ P を SalI および FseI で酵素消化後、大腸菌 C75 由来アルカリフィオスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに挿入。それを大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、pPS hEPO KI ベクター (図 1 3) を取得した。

## 実施例 2 2

### エレクトロポレーション用 pPS hEPO KI ベクターの調製

pPS hEPO KI ベクター 60  $\mu$ g を、スペルミジン添加 (1 mM pH7.0 米国シグマ)

バッファー（日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用Hバッファー）を用い、NotIを用いて37°Cで5時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5容量の100%エタノール、および0.1容量の3M酢酸ナトリウムを加え、-20°Cで16時間保存した。NotIで一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70%エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で70%エタノールを除き、1時間風乾させた。0.5μg/μLのDNA溶液となるようにHBS溶液を加え、1時間室温で保存し、エレクトロポレーション用pPS hEPO KIベクターの調製を行なった。

### 実施例23

pPS hEPO KIベクターとRSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞株を用いたPS hEPOマウスES細胞株の取得

ヒトEPO-cDNAが相同組換えにより免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子下流に挿入されたマウスES細胞株取得のため、実施例21で作製したpPS hEPO KIベクターを制限酵素NotI（日本国宝酒造）で線状化し、確立されている方法（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国）に従ってRSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞へ導入した。

RSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞の培養法は、記載の方法（相沢慎一、前記）に従い、栄養細胞はマイトイシンC（米国シグマ）処理したG418耐性初代培養細胞（日本国インビトロジェン社より購入）を用いた。まず、増殖させたRSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$ 個/mlとなるようにHBSに懸濁してから、0.5mlの細胞懸濁液を10μgのベクターDNAと混和し、ジーンパルサーチュベット（電極距離：0.4cm、米国バイオラッド）にてエレクトロポレーションを行った（容量：960μF、電圧：250V、室温）。エレクトロポレーションした細胞を10mlのES培地（相沢慎一、前記）に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した100mm組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン）1枚に播種した。36時間後に0.8μg/mlのピューロマイシン（米国シグマ）を含むES培地と置き換えた。7日後に生じたコロニーのうち計24個をピックアップし、それぞれを24穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その2/3を0.2mlの保存用培地(FBS

+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°Cにて保存した。残りの1/3は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して10<sup>6</sup>～10<sup>7</sup>個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kits(米国Gentra System社)により調製した。これらのピューロマイシン耐性RSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞ゲノムDNAを制限酵素EcoRI(日本国宝酒造)で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383号パンフレット(実施例48参照)に記載の発明で使用された、Ig軽鎖J $\kappa$ -C $\kappa$ ゲノムDNAの3'端のDNA断片(XhoI～EcoRI、約1.4kb、00/10383号パンフレット、特に図25)をプローブとして相同組換え体を検出した。その結果、24株中9株(37.5%)が相同組換え体であるという結果を得た。野生型TT2F細胞ではEcoRI消化により、1本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される(図14)が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認された。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されたものである。

#### 実施例24

PS hEPOマウスES細胞株およびBリンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的なBリンパ球が欠損し、抗体が産生されない(Kitamuraら、Nature, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的なBリンパ球は、大部分が注入したES細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000)に記載された免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトマウスについてMCH(ICR)(日本国日本クレア社)系統への戻し交配を3回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例23で得られ、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されていることが確認されたPS hEPOマウスES細胞株(№6)を凍結ストック

より立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン $\mu$ 鎖ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた8細胞期胚に、それぞれ胚1つあたり8~10個注入した。ES培地(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国)で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親MCH(ICR)マウス(日本国日本クレア社)の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約10個のインジェクション胚を移植した。実施例23のPS EPOマウスES細胞株(#6)を用いて作製されたインジェクション胚を計160個移植した結果、53匹の子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中にES細胞由来の野生色(濃茶)が認められるかどうかによって判定される。誕生した53匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわちES細胞の貢献の認められる個体は26匹であった。これらの結果より、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されているPS hEPOマウスES細胞株#6はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示された。

### 実施例25

pCkP2 hEPO KIベクターとマウスTT2F細胞株を用いたCkP2 hEPOマウスTT2F細胞株の取得

ヒトEPO-cDNAが相同組換えにより免疫グロブリン $\kappa$ 軽鎖遺伝子下流に挿入されたマウスES細胞株取得のため、実施例13で作製したpCkP2 hEPO KIベクターを制限酵素NotI(日本国宝酒造)で線状化し、確立されている方法(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国)に従ってマウスES細胞TT2F(Yagiら、Analytical Biochem., 214:70, 1993)へ導入した。

マウスTT2F細胞の培養法は、記載の方法(相沢慎一、前記)に従い、栄養細胞はマイトイシンC(米国シグマ)処理したG418耐性初代培養細胞(日本国インビトロジョン社より購入)を用いた。まず、増殖させたTT2F細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$ 個/mlとなるようにHBSに懸濁してから、0.5mlの細胞懸濁液を10 $\mu$ gのベクターDNAと混和し、ジーンパルサーキュベット(電極距離:0.4cm、

米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量: 960  $\mu$  F、電圧: 240V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。36 時間後に 0.8  $\mu$  g/ml のピューロマイシン (米国シグマ) を含む ES 培地と置き換えた。7 日後に生じたコロニーのうち計 96 個をピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (ES 培地 + 10% DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらのピューロマイシン耐性マウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンブロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XbaI~EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット、特に図 25) をプローブとして相同組換え体を検出した。その結果、96 株中 11 株 (11.5%) が相同組換え体であるという結果を得た。野生型 TT2F 細胞では EcoRI 消化により、1 本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される (図 15) が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認された。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EP0-cDNA が挿入されたものである。

## 実施例 2 6

CkP2 hEP0 マウス TT2F 細胞株より薬剤耐性遺伝子を除去した CkP2  $\Delta$  P hEP0 マウス TT2F 細胞株の取得

CkP2 hEP0 マウス TT2F 細胞株より薬剤耐性遺伝子 (Puro<sup>r</sup>) を除去した CkP2  $\Delta$  P hEP0 遺伝子導入 TT2F 細胞株取得のため、pCAGGS-Cre ベクター (Sunaga ら、Mol Reprod Dev., 46:109-113, 1997) を確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニアアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って CkP2

hEPO マウス TT2F 細胞へ導入した。

CkP2 hEPO マウス TT2F 細胞の培養法は、記載の方法（相沢慎一、前記）に従い、栄養細胞はマイトマイシン C（米国シグマ）処理した G418 耐性初代培養細胞（日本国インビトロジェン社より購入）を用いた。まず、増殖させた CkP2 hEPO マウス TT2F 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個／ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット（電極距離：0.4cm、米国バイオランド）にてエレクトロポレーションを行った（容量：960  $\mu$  F、電圧：250V、室温）。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地（相沢慎一、前記）に懸濁し、それより 2.5ml 分を、あらかじめフィーダー細胞を播種した 60mm 組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン）1 枚に播種した。30 時間後に ES 細胞 1000 個をあらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン）1 枚に播種した。6 日後に生じたコロニーのうち計 48 個をピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地（FBS+10%DMSO、米国シグマ）に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ～ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits（米国 Gentra System 社）により調製した。これらマウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI（日本国宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンブロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット（実施例 48 参照）に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片（XhoI～EcoRI、約 1.4kb、図 5）をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Puro<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド（15.6 K と 13.1 K）が検出され、Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド（15.6 K と 10.2 K）が検出される（図 15）。その結果、48 株中 4 株（8.3%）が CkP2 hEPO マウス TT2F 細胞株より薬剤耐性遺伝子（Puro<sup>r</sup>）が除去された TT2F 細胞株（CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞株）であるという結果を得た。

## 実施例 27

CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン  $\mu$  鎖遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, *Nature*, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン  $\mu$  鎖遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 26 で得られ、免疫グロブリン  $\kappa$  鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞株 (#8) を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン  $\mu$  鎖ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8~10 個注入した。ES 培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 26 の #8 を用いて作製されたインジェクション胚を計 80 個移植した結果、14 匹の子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中に ES 細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した 14 匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体は 10 匹であった。これらの結果より、免疫グロブリン  $\kappa$  鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞株 (#8) はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示された。

## 実施例 28

CkP2 hEPO マウス ES 細胞株より薬剤耐性遺伝子を除去した CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞株の取得

CkP2 hEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 ( $\text{Neo}^r$ ,  $\text{Puro}^r$ ) を除去した CkP2 loxP hEPO 遺伝子導入 ES 細胞株取得のため、pCAGGS-Cre ベクター (Sunaga ら、Mol Reprod Dev., 46:109–113, 1997) を確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って CkP2 hEPO マウス ES 細胞 (#30) へ導入した。

CkP2 hEPO マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトイマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジェン社より購入) を用いた。まず、増殖させた CkP2 hEPO マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ $\text{ml}$  となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を  $10 \mu\text{g}$  のベクターDNA と混和し、ジーンパルサー キュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量:  $960 \mu\text{F}$ 、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、それより 2.5ml 分を、あらかじめフィーダー細胞を播種した 60mm 細胞培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。30 時間後に ES 細胞 1000 個をあらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 細胞培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。6 日後に生じたコロニーのうち計 46 個をピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6 \sim 10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらマウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖  $\text{J}\kappa-\text{C}\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XhoI~EcoRI、約 1.4kb、図 5) をプローブとして LoxP 配列で挟まれた

Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Puro<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド (15.6 K と 13.1 K) が検出され、Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド (15.6 K と 10.2 K) が検出される (図 10)。また、上記と同様の操作で得られたサザンプロット膜を用い、実施例 10 で用いられた 3' KO-probe をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Neo<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド (7.4 K と 5.7 K) が検出され、Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド (5.7 K と 4.4 K) が検出される (図 10)。その結果、46 株中 1 株 (2.2%) が CkP2 ヒト EPO 遺伝子導入 ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 (Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>) が同時に除去された ES 細胞株 (CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞株) であるという結果を得た。

## 実施例 29

CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, Nature, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 28 で得られ、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞株 (#18) を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン  $\mu$  鎮ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあ

たり 8～10 個注入した。ES 培地（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、羊土社、1995）で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス（日本国日本クレア社）の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 28 の #18 を用いて作製されたインジェクション胚を計 240 個移植した結果、80 匹の子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中に ES 細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかによって判定される。誕生した 80 匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体は 52 匹であった。これらの結果より、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞株（#18）はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示された。

### 実施例 30

PS hEPO マウス ES 細胞株より薬剤耐性遺伝子を除去した PS loxP hEPO マウス ES 細胞株の取得

PS hEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子（Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>）を除去した PS loxP hEPO 遺伝子導入 ES 細胞株取得のため、pCAGGS-Cre ベクター（Sunaga ら、Mol Reprod Dev., 46:109–113, 1997）を確立されている方法（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国）に従つて PS hEPO マウス ES 細胞（#6）へ導入した。

PS hEPO マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法（相沢慎一、前記）に従い、栄養細胞はマイトイマイシン C（米国シグマ）処理した G418 耐性初代培養細胞（日本国インビトロジェン社より購入）を用いた。まず、増殖させた PS hEPO マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個／ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット（電極距離：0.4cm、米国バイオラッド）にてエレクトロポレーションを行った（容量：960  $\mu$ F、電圧：250V、室温）。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地（相沢慎一、前記）に懸濁しそれより 2.5ml 分を、あらかじめフィーダー細胞

を播種した 60mm 組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン）1枚に播種した。30 時間後に ES 細胞 1000 個をあらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン）1枚に播種した。6 日後に生じたコロニーのうち計 192 個をピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地（FBS+10%DMSO、米国シグマ）に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits（米国 Gentra System 社）により調製した。これらマウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI（日本国宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット（実施例 48 参照）に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片（XbaI ～EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット 図 25）をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Puro<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド（15.6 K と 12.7 K）が検出され、Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド（15.6 K と 9.8 K）が検出される（図 14）。また、上記と同様の操作で得られたサザンプロット膜を用い、実施例 10 で用いられた 3' K0-probe をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Neo<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド（7.4 K と 5.7 K）が検出され、Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド（5.7 K と 4.4 K）が検出される（図 14）。その結果、192 株中 2 株（1.0%）が PSEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子（Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>）が同時に除去された ES 細胞株（PS loxP hEP0 マウス ES 細胞株）であるという結果を得た。

### 実施例 3 1

PS loxP hEP0 マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的なBリンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, *Nature*, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的なBリンパ球は、大部分が注入したES細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトマウスについてMCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を3回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例30で得られ、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されていることが確認されたPS 1oxP hEPOマウスES細胞株 (#48) を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン $\mu$ 鎖ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた8細胞期胚に、それぞれ胚1つあたり8~10個注入した。ES培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約10個のインジェクション胚を移植した。実施例30の#48を用いて作製されたインジェクション胚を計240個移植した結果、70匹の子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中にES細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した70匹のうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわちES細胞の貢献の認められる個体は34匹であった。これらの結果より、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されているPS 1oxP hEPOマウスES細胞株#48はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示された。

### 実施例32

CkP2 hEPOマウスES細胞由来キメラマウス、NP hEPOマウスES細胞由来キメラマウス、PS hEPOマウスES細胞由来キメラマウスにおける、ヒトEPO遺伝子転写

## レベルの比較

### キメラマウス脾臓より mRNA サンプルの調製：

コントロールとして上記実施例 1 1 で作製された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株#32 由来のキメラマウス計 3 匹、上記実施例 1 6 で作製された CkP2 hEPO マウス ES 細胞株#57 由来のキメラマウス計 3 匹(キメラ率 100-70%)、上記実施例 2 0 で作製された NP hEPO マウス ES 細胞株#10 由来のキメラマウス計 3 匹 (キメラ率 100%)、上記実施例 2 4 で作製された PS hEPO マウス ES 細胞株#6 由来のキメラマウス計 3 匹 (キメラ率 100%) より、1 週齢、2 週齢、4 週齢それぞれで各群 1 匹より脾臓サンプルを摘出し、その直後に脾臓約 50 mg を液体窒素で凍結した。得られた各凍結サンプルに ISOGEN (日本ジーン、日本国) 1 ml を加え、ホモジナイザーを用いてサンプルを破碎後、添付されたマニュアルに従い RNA を抽出した。得られた RNA サンプルに 37 °C、15 分間、DNase 処理 (日本国 WAKO Deoxyribonuclease RT 等級) を行った。更に、RNasy Mini (ドイツ QIAGEN) を用いて、精製 RNA サンプルを取得した。

### ヒト EPO 遺伝子転写レベルの比較：

SuperScriptIII (Invitrogen) を用い、得られた精製 RNA サンプル 250 ng より cDNA を合成した。その後、37 °C、20 分間 RNase 処理を行い、RNase フリーの滅菌水による 10 倍希釈液 2.0 μl をその後の PCR に用いた。

ヒト EPO 遺伝子発現確認用プライマーとして、以下のオリゴ DNA を合成した。

hEPO-RT FW5: GGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTC (配列番号 5 5)

CkpolyAR2: CGCTTGTGGGAAGCCTCCAAGACC (配列番号 5 6)

ヒト EPO 遺伝子発現を確認するための PCR を以下のような条件で実施した。LA taq (日本国宝酒造) を用い、94 °C、10 秒インキュベート後 68 °C、1 分間インキュベートの 2 段階反応を 35 サイクル行った。その結果、コントロール群では 1 週齢から 4 週齢全てで増幅バンドが検出されなかったが、ヒト EPO 遺伝子が導入されたマウス ES 細胞を用いて作製された全てのキメラマウスの脾臓組織では、1 週齢から増幅バンドが検出された。NP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスと PS hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスの増幅バンド濃度は 2 週齢、4 週齢とほぼ等しく、CkP2h EPO マウス ES 細胞由来キメラマウスの増幅バンド濃度は

これらと比較するとやや低いことが確認された（図 16）。

また、各サンプル群で用いられている mRNA 量に偏りが生じていないかを確認する為、マウス Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子発現確認用プライマーとして、以下のオリゴ DNA を合成した。

mGAPDH5: CACCATGGAGAAGGCCGGGCCAC (配列番号 57)

mGAPDH3: ATCATACTTGGCAGGTTCTCCAGG (配列番号 58)

マウス GAPDH 遺伝子発現を確認するため PCR を以下のような条件で実施した。LA taq (日本国宝酒造) を用い、(94°C、30秒) → (65°C、30秒) → (72°C、30秒) 3段階のインキュベート反応を 25 サイクル行った。その結果、全てのサンプルでマウス GAPDH の発現がほぼ等しいレベルで検出され、ヒト EPO 遺伝子発現確認用プライマーを用いて検出された各サンプル間のバンドの濃度差がキメラマウス脾臓組織におけるヒト EPO 遺伝子発現レベルの差を反映していることが示された（図 16）。これらの結果は、ベクター構造が pCkP2 タイプよりも、pNP や pPS タイプのほうが転写レベルで発現に有利であることを示し、上記実施例 5 の *in vitro* 実験で得られた結果との相関が認められた。

### 実施例 3 3

CkP2 hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、Ck ΔP hEPO マウス TT2F 細胞由来キメラマウス、CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS loxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスにおける血清中ヒト EPO 濃度の比較

コントロールとして上記実施例 1 1 で作製された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株#32 由来のキメラマウス計 10 匹（キメラ率 80~20%）、上記実施例 1 6 で作製された CkP2 hEPO マウス ES 細胞株#69 由来のキメラマウス計 6 匹（キメラ率 80~20%）、上記実施例 2 0 で作製された NP hEPO マウス ES 細胞株#10 由来のキメラマウス計 4 匹（キメラ率 100%）、上記実施例 2 4 で作製された PS hEPO マウス ES 細胞株#6 由来のキメラマウス計 10 匹（キメラ率 80~20%）、上記実施例 2 7 で作製された CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞由来キメラマウス計 9 匹（キメラ率 60~10%）、上記実施例 2 9 で作製された CkP2 loxP hEPO マウス E

S 細胞株#18 由来キメラマウス計 20 匹 (キメラ率 90~10%)、上記実施 3 1 で作製された PS loxP hEPO マウス ES 細胞株#48 由来キメラマウス計 13 匹 (キメラ率 90~10%) より 8 週齢の時点で眼窩採血し得られた血清中のヒト EPO 濃度を ELISA キット (Quantikine IVD In Vitro Diagnostic human Erythropoietin. R&D system) を用いて測定した。その結果、コントロールとして上記実施例 1 1 で作製された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株#32 由来のキメラマウス計 10 匹 (キメラ率 80~20%) 由来の血清中ヒト EPO 濃度は全て検出限界 (12.5 pg/ml) 以下であったが、上記実施例 1 6 で作製された CkP2 hEPO マウス ES 細胞株#69 由来のキメラマウス計 6 匹 (キメラ率 80~20%) 由来の血清中ヒト EPO 濃度の平均値は 5.3 ng/ml、上記実施例 2 0 で作製された NP hEPO マウス ES 細胞株#10 由来のキメラマウス計 4 匹 (キメラ率 100%) 由来の血清中ヒト EPO 濃度の平均値は 14.7 ng/ml、上記実施例 2 4 で作製された PS hEPO マウス ES 細胞株#6 由来のキメラマウス計 10 匹 (キメラ率 80~20%) 由来の血清中ヒト EPO 濃度の平均値は 47.9 ng/ml、上記実施例 2 7 で作製された CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞由来キメラマウス計 9 匹 (キメラ率 60~10%) 由来の血清中ヒト EPO 濃度の平均値は 63.4 ng/ml、上記実施例 2 9 で作製された C<sub>κ</sub>P2 loxP hEPO マウス ES 細胞株#18 由来キメラマウス計 20 匹 (キメラ率 90~10%) 由来の血清中ヒト EPO 濃度の平均値は 211 ng/ml、上記実施 3 1 で作製された PS loxP hEPO マウス ES 細胞株#48 由来キメラマウス計 13 匹 (キメラ率 90~10%) 由来の血清中ヒト EPO 濃度の平均値は 1103 ng/ml であった。更に、図 1 7 及び Table II に、上記実施例で作製されたキメラマウスの血清を用い、1、2、4、6、8 週齢で測定したヒト EPO 濃度値を示す。これらの結果から、CkP2 hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞由来キメラマウス、CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS loxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスの順に血清中ヒト EPO 濃度の増加が認められた。

これらの結果はベクター構造が pC<sub>κ</sub>P2 タイプ、pNP タイプ、pPS タイプの順番にキメラマウス血中のヒト EPO 量が増加することを示し、上記実施例 6 の *in vitro* で得られた結果との相関が認められた。実施例 6 の結果との相関が認めら

れしたことから、ミエローマ細胞を用いた *in vitro* アッセイ系によって、本発現システムを用いて作製されるキメラマウス血清中の導入遺伝子発現量が推測されることが示された。また、CkP2 hEPO マウス ES (TT2F) 細胞より薬剤耐性遺伝子を除去 (CkP2 1oxP hEPO タイプ、CkP2 ΔP hEPO タイプ) することによっても、血清中ヒト EPO 濃度が増加することが示された。更に PS hEPO マウス ES 細胞より薬剤耐性遺伝子を除去した ES 細胞を用いキメラマウスを作製した場合、その血清中濃度はそれぞれ単独の操作で得られた増加量に比べ相乗的に増加し、極めて興味深い結果が得られた。すなわち、用いる Ig  $\kappa$  プロモーター領域の変更と導入遺伝子固有のリーダー配列コード領域からイントロン領域を含む Ig  $\kappa$  由来のリーダー配列コード領域への変更ないし導入遺伝子の近傍に位置する薬剤耐性遺伝子の除去操作はそれぞれ単独であってもキメラマウスにおける導入遺伝子発現量の向上に有用であることを示しているが、更に用いる Ig  $\kappa$  プロモーター領域の変更と導入遺伝子固有のリーダー配列コード領域からイントロン領域を含む Ig  $\kappa$  由来のリーダー配列コード領域への変更及び導入遺伝子の近傍に位置する薬剤耐性遺伝子の除去操作を全てを行うことによって、キメラマウスにおける導入遺伝子発現量がそれぞれ単独の操作によって向上した発現量に比べ相乗的に向上することを示し、本発明に記載された方法が遺伝子およびその産物の生体内における機能解析に極めて有用であることを示している。

### 実施例 3 4

CkP2 hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞由来キメラマウス、CkP2 1oxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PS 1oxP hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスにおける末梢血血球解析

コントロールとして上記実施例 1 1 で作製された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株#32 由来のキメラマウス計 10 匹 (キメラ率 80~20%)、上記実施例 1 6 で作製された CkP2 hEPO マウス ES 細胞株#69 由来のキメラマウス計 6 匹 (キメラ率 80~20%)、上記実施例 2 0 で作製された NP hEPO マウス ES 細胞株#10 由来のキメラマウス計 4 匹 (キメラ率 100%)、上記実施例 2 4 で作製された

PS hEPO マウス ES 細胞株#6 由来のキメラマウス計 10 匹（キメラ率 80～20%）、上記実施例 2 7 で作製された CkP2 ΔP hEPO マウス TT2F 細胞由来キメラマウス計 9 匹（キメラ率 60～10%）、上記実施例 2 9 で作製された CkP2 loxP hEPO マウス ES 細胞株#18 由来キメラマウス計 20 匹（キメラ率 90～10%）、上記実施 3 1 で作製された PS loxP hEPO マウス ES 細胞株#48 由来キメラマウス計 13 匹（キメラ率 90～10%）より 8 週齢の時点で眼窩採血し、血球測定装置（日本国 Bayer Medical (株) 製、ADVIA 120 HEMATOLOGY SYSTEM）を用いて末梢血血球解析を実施した。コントロールマウス群にくらべ、ヒト EPO 遺伝子が導入されたキメラマウスは上記全ての群において平均 1.64 倍以上の赤血球数増加が認められた。しかしながら、各群間の赤血球数には有意な差は認められなかった。また、コントロール群のヘマトクリット値は平均 58% であったが、ヒト EPO 遺伝子が導入されたキメラマウスは上記全ての群において平均 90% 以上の値を示し、ヒト EPO 遺伝子導入により有意なヘマトクリット値の増加が認められた。しかしながら赤血球数と同様各群間に有意な差は認められなかった。上記実施例 3 3 の各群間で血清中ヒト EPO 濃度の有意な差が認められるにも係わらず、血球解析において有意な差が認められない理由として、最も発現量の少ない CkP2 hEPO マウス ES 細胞より作製されたキメラマウスのヒト EPO 発現量においても既に増加の上限値に達していることが原因と考えられる。従って、本発明に記載された方法が遺伝子およびその産物の生体内における機能解析に有用であることを示している。

### 実施例 3 5

#### pCk loxPV KI ベクターの構築

LoxP 配列の一部に変異が導入（34bp で構成される loxP 配列の 5' 側から 15 番目の T が A に、20 番目の G が C に置換。Lee ら、Gene, 216: 55-65, 1998）された loxPV を薬剤耐性遺伝子（Puro<sup>r</sup>）の両端に持つ pCkP2 KI ベクターである pCk loxPV KI ベクター（図 1 8）の構築を行った。

#### 3 5-1. PGK-Puro 断片の調製

Lox-P Puro プラスミド（WO 00/10383 号パンフレット）を制限酵素 BamHI 消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動によって分離した。1.7kb の断片を含むゲルよ

り QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって PGK-Puro 断片を回収した。

### 3 5-2. Ck polyA partial 断片の調製

上記実施例 1 2 の pCkP2 KI ベクターを元に、以下の DNA(プライマー) を設計した。

Ck pA NheI F: CCTAGCTAGCAGACAAAGGTCTGAGACGCCAC (配列番号 5 7)

Ck pA PacI R: CCTTAATTAATGGATTCAGGGCAACTAAC (配列番号 5 8)

KOD-plus-(日本国東洋紡)を用い添付文書にしたがって反応液を調製した。50  $\mu$  l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 7.5 pmol、鑄型として TT2F マウス ES ゲノムを添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒/58°C 30 秒/68°C 30 秒を 1 サイクルとして 32 サイクル増幅した。得られた約 300bp の増幅断片を 2% ゲルで分離回収した。回収したゲルから QIAquick Gel Extraction Kit を用い、添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を制限酵素 NheI/PacI で消化し、2% アガロースゲルでサイズ分画した。QIAquick Gel Extraction Kit を用い添付文書にしたがって、ゲルから酵素処理断片を回収した。この断片を上記実施例 1 の pBS+ PFN の NheI/PacI サイトにサブクローニングし、大腸菌 Competent high DH5(日本国東洋紡) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、シーケンスを確認した。CkP2 KI ベクターの完全長 Ck ポリ A と比較して、増幅エラーの見られなかった p(部分長 Ck ポリ A) を PacI/NheI 消化した。2% ゲルで 303bp の断片を分離、QIAquick Gel Extraction Kit を用い添付文書にしたがって部分長 Ck ポリ A 断片を回収した。

### 3 5-3. pCkP2 KI ベクターに一本鎖化サイト AscI を加えたベクター・・・

pCkP2+As KI

以下の合成オリゴをアニールさせて、AscI リンカーを合成した。

AscI top linker : GGCCAGGCGCGCCTTGC (配列番号 4 7)

AscI bottom linker : GGCGCAAGGCGCGCCT (配列番号 4 8)

pCkP2 KI ベクターを制限酵素 NotI (Roche) で消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後に ligation kit ver.2 (日本国タカラバイオ) を使用したライゲーション反応により AscI リンカーを導入した。それを大腸菌 XL10-Gold

Ultracompetent Cells(米国 STRATAGENE)に導入して得られた形質転換体より DNA を調製し、挿入断片の塩基配列を確認した。

### 35-4. Ck 3' ゲノム断片の調製

上記 35-3 の pCkP2+As KI を制限酵素 Hpy99I で消化し、0.8%アガロースゲルで 8820bp の断片を分離した。この目的断片を含むゲルを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit を用い添付文書にしたがって DNA を回収した。回収した DNA は Blunting high(日本国東洋紡)を用いて、添付文書にしたがって末端の平滑化を行った。フェノール抽出によって DNA 精製後、制限酵素 XhoI で消化した。0.8%アガロースゲルで 8280bp の断片を分離し、この目的断片を含むゲルを切り出して、QIAquick Gel Extraction Kit を用い添付文書にしたがって Ck 3' ゲノム断片を回収した。

### 35-5. loxPV NheI/XhoI 断片の調製

上記実施例 1 の pBS+PFN を制限酵素 SalI で消化し、仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端の脱リン酸化を行った後に、以下のオリゴ DNA より合成した loxP-Bg1III-PmeI-HpaI リンカーを挿入した。

変異型 loxP F :

TCGATAACTCGTATAAAGTATCCTATACGAAGTTAGATCTATAACTCGTATAAAGTATCCTATACGAA  
GTTATGTTAACGTTAACG (配列番号 59)

変異型 loxP R:

TCGACGTTAACGTTAACATAACTCGTATAGGATACCTTATACGAAGTTAGATCTATAACTCGTATA  
GGATACTTATACGAAGTTA (配列番号 60)

大腸菌 Competent high DH5 $\alpha$ に導入し、得られた形質転換体より DNA を調製した。連結部分の塩基配列を確認し、リンカーが目的の方向に挿入されていた pBS2272 を取得した。

pBS2272 を制限酵素 Bg1III 消化し、仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて末端脱リン酸化した後、上記 35-1 で調製した PGK-Puro 断片を連結した。大腸菌 Competent high DH5 $\alpha$ に導入し、得られた形質転換体より DNA を調製した。連結部分の塩基配列を確認し、PGK-Puro 断片が目的の方向にクローニングされていたプラスミド ploxPV-puro を得た。

このプラスミドを制限酵素 NheI/PacI で消化し、末端を仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて脱リン酸化した。ここに上記 3.5-2 で調製した部分長 Ck ポリ A 断片を挿入した。XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に形質転換し、得られたクローンよりプラスミド DNA を調製して塩基配列の確認を行った。つなぎ目及び内部の配列を確認し、エラーの無いプラスミド ploxPV-Puro-ポリ A を取得した。

続いて制限酵素 HpaI/XhoI で消化し、末端を仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて脱リン酸化した後に上記 3.5-4 で調製した Ck 3' ゲノム断片を導入した。XL10-Gold Ultracompetent Cells に形質転換し、得られたクローンよりプラスミド DNA を調製して塩基配列の確認を行った。つなぎ目の塩基配列を確認して、予定通りの連結をしていたプラスミド ploxPV NheI/XhoI を得た。このプラスミドを制限酵素 NheI/XhoI 消化し、約 10.5kb の loxPV NheI/XhoI 断片を回収した。

### 3.5-6. pCk loxPV KI ベクターの構築

上記 3.5-3 の pCkP2+As KI を NheI/XhoI 消化し、9968bp の断片を 0.8% アガロースゲル分画によって回収した。末端を仔牛小腸由来アルカリフオスファターゼを用いて脱リン酸化し、上記 3.5-5 で調製した loxPV NheI/XhoI 断片と連結した。連結部分の塩基配列を確認し、pCk loxPV KI ベクター (図 1.8) を得た。

## 実施例 3.6

### エレクトロポレーション用 pCk loxPV KI ベクターの調製

pCk loxPV KI ベクター 60 μg を、スペルミジン添加 (1 mM pH7.0 米国シグマ) バッファー (日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用 H バッファー) を用い、NotI を用いて 37°C で 5 時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5 容量の 100% エタノール、および 0.1 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、-20°C で 16 時間保存した。NotI で一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70% エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で 70% エタノールを除き、1 時間風乾させた。0.5 μg/μL の DNA 溶液となるように HBS 溶液を加え、1 時間室温で保存し、エレクトロポレーション用 pCk loxPV KI ベクターの調製を行なった。

## 実施例 3 7

pCk loxPV KI ベクターと RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株を用いた Ck loxPV マウス ES 細胞株の取得

変異 loxP 配列を両端に持つ薬剤耐性遺伝子 (loxPV Puro<sup>r</sup>) が相同組換えにより免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子下流に挿入された Ck loxPV マウス ES 細胞株取得のため、実施例 3 5 で作製した pCk loxPV KI ベクターを制限酵素 NotI (日本国宝酒造) で線状化し、確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞へ導入した。

RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジェン社より購入) を用いた。まず、増殖させた RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量: 960  $\mu$ F、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。36 時間後に 0.8  $\mu$ g/ml のピューロマイシン (米国シグマ) を含む ES 培地と置き換えた。7 日後に生じたコロニーのうち計 24 個をピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS + 10% DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらのピューロマイシン耐性 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施

例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XhoI~EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット、特に図 25) をプローブとして相同組換え体を検出した。その結果、24 株中 6 株 (25%) が相同組換え体であるという結果を得た。野生型 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞では EcoRI 消化により、1 本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される (図 19) が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認された。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流に薬剤耐性遺伝子 (loxPV Puro<sup>r</sup>) が挿入されたものである。

### 実施例 3 8

Ck loxPV マウス ES 細胞株より薬剤耐性遺伝子を除去した  $\Delta$ GP マウス ES 細胞株の取得

Ck loxPV マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 (Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>) を除去した  $\Delta$ GP マウス ES 細胞株取得のため、pCAGGS-Cre ベクター (Sunaga ら、Mol Reprod Dev., 46:109-113, 1997) を確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って Ck loxPV マウス ES 細胞株 (# 16) へ導入した。

Ck loxPV マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジョン社より購入) を用いた。まず、増殖させた Ck loxPV マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーチュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量: 960  $\mu$ F、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、それより 2.5ml 分を、あらかじめフィーダー細胞を播種した 60mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。30 時間後に ES 細胞 1000 個をあらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン

ン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1枚に播種した。6日後に生じたコロニーのうち計24個をピックアップし、それぞれを24穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その2/3を0.2mlの保存用培地(FBS+10%DMSO、米国シグマ)に懸濁し、-80°Cにて保存した。残りの1/3は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kits(米国Gentra System社)により調製した。これらマウスES細胞ゲノムDNAを制限酵素EcoRI(日本国宝酒造)で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383号パンフレット(実施例48参照)に記載の発明で使用された、Ig軽鎖J $\kappa$ -C $\kappa$ ゲノムDNAの3'端のDNA断片(XhoI~EcoRI、約1.4kb、WO 00/10383号パンフレット、特に図25)をプローブとしてLoxP配列で挟まれたPuro<sup>r</sup>遺伝子のみが除去されたES細胞株を検出した。Puro<sup>r</sup>遺伝子を保持したES細胞ではEcoRI消化により、2本のバンド(15.6Kと12.5K)が検出され、Puro<sup>r</sup>遺伝子のみが除去されたES細胞株ではEcoRI消化により、2本のバンド(15.6Kと9.6K)が検出される(図19)。また、上記と同様の操作で得られたサザンプロット膜を用い、実施例10で用いられた3'KO-probをプローブとしてLoxP配列で挟まれたNeo<sup>r</sup>遺伝子のみが除去されたES細胞株を検出した。Neo<sup>r</sup>遺伝子を保持したES細胞ではEcoRI消化により、2本のバンド(7.4Kと5.7K)が検出され、Neo<sup>r</sup>遺伝子のみが除去されたES細胞株ではEcoRI消化により、2本のバンド(5.7Kと4.4K)が検出される(図19)。その結果、24株中23株(96%)という極めて高い効率でCk1oxPVマウスES細胞株より2種の薬剤耐性遺伝子(Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>)が同時に除去されたES細胞株(△GPマウスES細胞株)が取得された(図19)。上記実施例28、30においても2種の薬剤耐性遺伝子をCre酵素によって同時に除去する操作を実施したが、2種の薬剤耐性遺伝子のみが同時に除去された細胞株が取得された効率はそれぞれ2.2%, 1%と極めて低くかった。これらの結果から、同じLoxP配列を両端に持つ2種の薬剤耐性遺伝子のみをゲノム上から同時かつ特異的に除去することは困難であるが、変異配列を持つLoxP(LoxPV)を用いることで、2種の薬剤耐性遺伝子のみを同時かつ特異的に除去することが極めて容易に達成されることが示された。

## 実施例 3 9

## pCk loxPV hEPO KI ベクターの構築

## 3 9-1. CkP2 ver. 3.1 ベクターの構築

上記実施例 3 5 で構築された pCk loxPV KI の PacI 認識サイトをなくすため、PacI 消化を行い、Blunting high を用いて平滑化反応を行った。次いで自己環状化を行ってシークエンスにより PacI 認識サイトがなくなった事を確認し、CkP2 ver. 3.1 ベクターを得た。

## 3 9-2. ヒト erythropoietin DNA 断片の作製

hEPO Np : CCGCTCGAGCGGCCACCATGGGGGTGCACGAATGTCCTG (配列番号 4 5)

hEPO Rp : CCGCTCGAGCGGTCACTGTCCCCGTGCCTGCA (配列番号 4 6)

KOD-plus- (日本国東洋紡) を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50  $\mu$  l 反応液中に上記 2 種のプライマー各 10 pmol、鑄型としてヒト EPO cDNA を添加し、94°C 2 分保温した後、94°C 15 秒および 68°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅し、得られたシグナル配列を含む 580bp の増幅断片を 0.8% ゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。回収された PCR 増幅断片を XhoI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

pBluescriptII SK (-) (米国 STRATAGENE) を XhoI 消化し、0.8% アガロースゲルより分離精製した後に仔牛小腸由来アルカリフェオヌファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、上記回収された DNA 断片を挿入し、それを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入した。得られた形質転換体より DNA を調整し、挿入断片のシークエンスを行った。PCR による変異の無いクローンを選択し XhoI 消化した後、0.8% アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから QIAquick Gel Extraction Kit (ドイツ QIAGEN) を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。

## 3 9-3. pCkloxPV hEPO KI ベクターの構築

上記 3 9-1 の CkP2 ver. 3.1 ベクターを SalI で消化後、仔牛小腸由来アルカリフェオヌファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに、3 9-2 で作製した

DNA 断片を挿入した後、大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells(米国 STRATAGENE)に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、pCk loxPV hEPO KI ベクター(図 20)を取得した。

#### 実施例 4 0

##### Electroporation 用 pCk loxPV hEPO KI ベクターの調製

pCk loxPV hEPO KI ベクター 60  $\mu$ g を、スペルミジン添加 (1 mM pH7.0 米国シグマ) バッファー(日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用 H バッファー) を用い、NotI を用いて 37°C で 5 時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5 容量の 100% エタノール、および 0.1 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、-20°C で 16 時間保存した。NotI で一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70% エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で 70% エタノールを除き、1 時間風乾させた。0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L の DNA 溶液となるように HBS 溶液を加え、1 時間室温で保存し、Electroporation 用 pCk loxPV hEPO KI ベクターの調製を行なった。

#### 実施例 4 1

##### pCk loxPV hEPO KI ベクターと RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株を用いた CL hEPO マウス ES 細胞株の取得

ヒト EPO-cDNA が相同組換えにより免疫グロブリン  $\kappa$  軽鎖遺伝子下流に挿入された CL hEPO マウス ES 細胞株取得のため、実施例 3 9 で作製した pCk loxPV hEPO KI ベクターを制限酵素 NotI(日本国宝酒造)で線状化し、確立されている方法(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国)に従って RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞へ導入した。

RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法(相沢慎一、前記)に従い、栄養細胞はマイトイシン C(米国シグマ)処理した G418 耐性初代培養細胞(日本国インビトロジェン社より購入)を用いた。まず、増殖させた RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞をトリプシン処理し、3  $\times 10^7$  個/ $ml$  となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベ

クターDNAと混和し、ジーンパルサーキュベット（電極距離：0.4cm、米国バイオラッド）にてエレクトロポレーションを行った（容量：960μF、電圧：250V、室温）。エレクトロポレーションした細胞を10mlのES培地（相沢慎一、前記）に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した100mm組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン）1枚に播種した。36時間後に0.8μg/mlのピューロマイシン（米国シグマ）を含むES培地と置き換えた。7日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれを24穴プレートでコンフルエンントになるまで増殖させ、その2/3を0.2mlの保存用培地（FBS+10%DMSO、米国シグマ）に懸濁し、-80°Cにて保存した。残りの1/3は12穴ゼラチンコートプレートに播種し、2日間培養して10<sup>6</sup>～10<sup>7</sup>個の細胞からゲノムDNAをPuregene DNA Isolation Kits（米国Gentra System社）により調製した。これらのピューロマイシン耐性RSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞ゲノムDNAを制限酵素EcoRI（日本国宝酒造）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンブロットを行い、WO 00/10383号パンフレット（実施例48参照）に記載の発明で使用された、Ig軽鎖J<sub>κ</sub>-C<sub>κ</sub>ゲノムDNAの3'端のDNA断片(XhoI～EcoRI、約1.4kb、WO 00/10383号パンフレット、特に図25)をプローブとして相同組換え体を検出した。野生型RSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞ではEcoRI消化により、1本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される（図21）が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認される。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン<sub>κ</sub>鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されたものである。

#### 実施例4 2

CL hEPOマウスES細胞株およびBリンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン<sub>μ</sub>鎖遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的なBリンパ球が欠損し、抗体が産生されない（Kitamuraら、Nature, 350:423-426, 1991）。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚

を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的なBリンパ球は、大部分が注入したES細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトマウスについてMCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を3回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例4-1で得られ、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されていることが確認されたCL hEPOマウスES細胞株を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン $\mu$ 鎖ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた8細胞期胚に、それぞれ胚1つあたり8~10個注入した。ES培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約10個のインジェクション胚を移植した。実施例4-1のCL hEPOマウスES細胞株を用いて作製されたインジェクション胚を移植した結果、子キメラマウスが誕生する。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中にES細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した子キメラマウスのうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわちES細胞の貢献の認められる個体が得られる。これらの結果より、免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されているCL hEPOマウスES細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示される。

#### 実施例4-3

##### pNP loxPV hEPO KI ベクターの構築

###### 4-3-1. pCk loxPV $\Delta$ Pの構築 (mutant loxP大ベクター)

上記実施例3-9-1で作製されたCkP2 ver. 3.1ベクターを制限酵素HpaII/NheIで消化し、約19.5kbの断片を0.8%アガロースゲル分画によって回収した。末端は仔牛小腸由来アルカリリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した。このベクタ

一に上記実施例 1 7 の 5 の pCkpAMCS を制限酵素 HpaI、NheI (Roche) で消化し、0.8% アガロースゲルより回収した Ck-polyA-MCS を含む約 700bp の断片を導入した。連結部分及び内部の塩基配列を確認し、pCk loxPVΔP を得た。

#### 4 3 - 2. pNP loxPV hEPO KI ベクターの構築

上記実施例 2 で作製された pNPs hEPO *in vitro* 用ベクターを SalI 及び FseI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより約 1.2kb の断片を分離精製した後、上記 4 3 - 1 の pCk loxPVΔP を SalI および FseI で酵素消化後、大腸菌 C75 由来アルカリリフォスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに挿入。それを大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、pNP loxPV hEPO KI ベクター (図 2 2) を取得した。

#### 実施例 4 4

##### Electroporation 用 pNP loxPV hEPO KI ベクターの調製

pNP loxPV hEPO KI ベクター 60 μg を、スペルミジン添加 (1 mM pH7.0 米国シグマ) バッファー (日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用 H バッファー) を用い、NotI を用いて 37°C で 5 時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5 容量の 100% エタノール、および 0.1 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え、-20°C で 16 時間保存した。NotI で一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70% エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で 70% エタノールを除き、1 時間風乾させた。0.5 μg/μL の DNA 溶液となるように HBS 溶液を加え、1 時間室温で保存し、Electroporation 用 pNP loxPV hEPO KI ベクターの調製を行なった。

#### 実施例 4 5

##### pNP loxPV hEPO KI ベクターと RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株を用いた NL hEPO マウス ES 細胞株の取得

ヒト EPO-cDNA が相同組換えにより免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子下流に挿入された NL hEPO マウス ES 細胞株取得のため、実施例 4 3 で作製した pNP loxPV hEPO

KI ベクターを制限酵素 NotI (日本国宝酒造) で線状化し、確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞へ導入した。

RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジェン社より購入) を用いた。まず、増殖させた RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量: 960  $\mu$ F、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。36 時間後に 0.8  $\mu$ g/ml のピューロマイシン (米国シグマ) を含む ES 培地と置き換えた。7 日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーレントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらのピューロマイシン耐性 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XhoI ~EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット、特に図 25) をプローブとして相同組換え体を検出した。野生型 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞では EcoRI 消化により、1 本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される (図 23) が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認される。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト

EPO-cDNA が挿入されたものである。

#### 実施例 4 6

NL hEPO マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, *Nature*, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 4 5 で得られ、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された NL hEPO マウス ES 細胞株を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン  $\mu$  鎮ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8 ~ 10 個注入した。ES 培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 4 5 の NL hEPO マウス ES 細胞株を用いて作製されたインジェクション胚を移植した結果、子キメラマウスが誕生する。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中に ES 細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した子キメラマウスのうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体が得られる。これらの結果より、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている NL hEPO マウス ES 細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持

していることが示される。

#### 実施例 4 7

##### pUS hEPO KI ベクターの構築

上記実施例 1 の pPSs hEPO *in vitro* 用ベクターを SalI 及び FseI で酵素消化し、0.8% アガロースゲルより約 1.3kb の断片を分離精製した後、上記実施例 4 3 で作製された pCk loxPVΔP を SalI および FseI で酵素消化後、大腸菌 C75 由来アルカリフォスファターゼを用いて末端脱リン酸化したものに挿入。それを大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (米国 STRATAGENE) に導入した。得られた形質転換体より DNA を調製し、連結部分の塩基配列を確認して、pUS hEPO KI ベクター (図 24) を取得した。

#### 実施例 4 8

##### Electroporation 用 pUS hEPO KI ベクターの調製

pUS hEPO KI ベクター 60 μg を、スペルミジン添加 (1 mM pH7.0 米国シグマ) バッファー (日本国ロシュ・ダイアグノスティックス、制限酵素用 H バッファー) を用い、NotI を用いて 37°C で 5 時間消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、2.5 容量の 100% エタノール、および 0.1 容量の 3M 酢酸ナトリウムを加え、-20°C で 16 時間保存した。NotI で一本鎖化されたベクターを遠心して回収後、70% エタノールを加えて滅菌した。クリーンベンチ内で 70% エタノールを除き、1 時間風乾させた。0.5 μg/μL の DNA 溶液となるように HBS 溶液を加え、1 時間室温で保存し、エレクトロンポレーション用 pUS hEPO KI ベクターの調製を行なった。

#### 実施例 4 9

##### pUS hEPO KI ベクターと RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株を用いた PL hEPO マウス ES 細胞株の取得

ヒト EPO-cDNA が相同組換えにより免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子下流に挿入された PL hEPO マウス ES 細胞株取得のため、実施例 4 7 で作製した pUS hEPO KI ベクターを制限酵素 NotI (日本国宝酒造) で線状化し、確立されている方法 (相

沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞へ導入した。

RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジェン社より購入) を用いた。まず、増殖させた RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量: 960  $\mu$ F、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。36 時間後に 0.8  $\mu$ g/ml のピューロマイシン (米国シグマ) を含む ES 培地と置き換えた。7 日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらのピューロマイシン耐性 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XhoI ~ EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット 図 25) をプローブとして相同組換え体を検出した。野生型 RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞では EcoRI 消化により、1 本のバンドが検出された。相同組換え体においては、このバンドに加えてその下部に新たなバンドが出ることが予想される (図 25) が、ピューロマイシン耐性株においてこの新たなバンドが確認される。すなわち、これらのクローンは一方のアレルの免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されたものである。

## 実施例 5 0

PL hEPO マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, *Nature*, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 4 9 で得られ、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された PL hEPO マウス ES 細胞株を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン  $\mu$  鎮ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8 ~ 10 個注入した。ES 培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、19995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 4 9 の PL hEPO マウス ES 細胞株を用いて作製されたインジェクション胚を移植した結果、子キメラマウスが誕生する。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中に ES 細胞由来の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した子キメラマウスのうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体が得られる。これらの結果より、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている PL hEPO マウス ES 細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示される。

## 実施例 5 1

### CL hEPO マウス ES 細胞株より薬剤耐性遺伝子を除去した Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞株の取得

CL hEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 ( $\text{Neo}^r$ ,  $\text{Puro}^r$ ) を除去した Ck loxPV hEPO 遺伝子導入 ES 細胞株取得のため、pCAGGS-Cre ベクター (Sunaga ら、 Mol Reprod Dev., 46:109-113, 1997) を確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニアアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従つて CL hEPO マウス ES 細胞へ導入する。

CL hEPO マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトイマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジョン社より購入) を用いた。まず、増殖させた CL hEPO マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ $\text{ml}$  となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を  $10 \mu\text{g}$  のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量:  $960 \mu\text{F}$ 、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、それより 2.5ml 分を、あらかじめフィーダー細胞を播種した 60mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。30 時間後に ES 細胞 1000 個をあらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。6 日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらマウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサンプルロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖  $\text{J}\kappa$ - $\text{C}\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XbaI~EcoRI、

約 1.4kb、W0 00/10383 号パンフレット、特に図 25) をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Puro<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド (15.6 K と 13.1 K) が検出され、Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド (15.6 K と 10.2 K) が検出される(図 21)。また、上記と同様の操作で得られたサザンブロット膜を用い、実施例 10 で用いられた 3' K0-prob をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Neo<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド (7.4 K と 5.7 K) が検出され、Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド (5.7 K と 4.4 K) が検出される(図 21)。これらの結果から、Ck loxPV hEP0 マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 (Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>) が同時に除去された ES 細胞株 (Ck loxPV hEP0 マウス ES 細胞株) が得られた。

## 実施例 5 2

Ck loxPV hEP0 マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, Nature, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 5 1 で得られ、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された Ck loxPV hEP0 マウス ES 細胞株を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン  $\mu$  鎮ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8~10

個注入した。ES 培地（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国）で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス（日本国日本クレア社）の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 5-1 の Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞株を用いて作製されたインジェクション胚を移植した結果、子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中に ES 細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかによって判定された。誕生した子キメラマウスのうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体が得られた。これらの結果より、免疫グロブリン  $\kappa$ 鎖遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示された。

### 実施例 5-3

NL hEPO マウス ES 細胞株より薬剤耐性遺伝子を除去した NP loxPV hEPO マウス ES 細胞株の取得

NL hEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 (Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>) を除去した NP loxPV hEPO 遺伝子導入 ES 細胞株取得のため、pCAGGS-Cre ベクター (Sunaga ら、Mol Reprod Dev., 46:109-113, 1997) を確立されている方法（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国）に従つて NL hEPO マウス ES 細胞へ導入する。

NL hEPO マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法（相沢慎一、前記）に従い、栄養細胞はマイトイマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞（日本国インビトロジェン社より購入）を用いた。まず、増殖させた NL hEPO マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を 10  $\mu$ g のベクター-DNA と混和し、ジーンパルサーキュベット（電極距離：0.4cm、米国バイオラッド）にてエレクトロポレーションを行つた（容量：960  $\mu$ F、電圧：250V、室温）。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地（相沢慎一、前記）に懸濁し、それより 2.5ml 分を、あらかじめフィーダー細

胞を播種した 60mm 組織培養用プラスチックシャーレ(ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1枚に播種した。30 時間後に ES 細胞 1000 個をあらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ(ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1枚に播種した。6 日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地(FBS+10%DMSO、米国シグマ)に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits(米国 Gentra System 社)により調製した。これらマウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI(日本国宝酒造)で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット(実施例 48 参照)に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片(XhoI~EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット、特に図 25)をプローブとして LoxP 配列で挿まれた Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Puro<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド(15.6 K と 12.9 K)が検出され、Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド(15.6K と 10.0K)が検出される(図 23)。また、上記と同様の操作で得られたサザンプロット膜を用い、実施例 10 で用いられた 3' KO-probe をプローブとして LoxP 配列で挿まれた Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Neo<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド(7.4 K と 5.7 K)が検出され、Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド(5.7 K と 4.4 K)が検出された(図 23)。これらの結果から、CL hEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子(Neo<sup>r</sup>、Puro<sup>r</sup>)が同時に除去された ES 細胞株(NP loxPV hEPO マウス ES 細胞株)が得られた。

#### 実施例 5 4

NP loxPV hEPO マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン $\mu$ 鎖遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B

リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, *Nature*, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 5 3 で得られ、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された NP 1oxPV hEPO マウス ES 細胞株を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン  $\mu$  鎮ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8 ~ 10 個注入した。ES 培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 5 3 の NP 1oxPV hEPO マウス ES 細胞株を用いて作製されたインジェクション胚を移植した結果、子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由來の白色の中に ES 細胞由來の野生色 (濃茶) が認められるかどうかによって判定される。誕生した子キメラマウスのうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわち ES 細胞の貢献の認められる個体が得られる。これらの結果より、免疫グロブリン  $\kappa$  鎇遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されている NP 1oxPV hEPO マウス ES 細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示される。

## 実施例 5 5

PL hEPO マウス ES 細胞株より薬剤耐性遺伝子を除去した US hEPO マウス ES 細胞株の取得

PL hEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 ( $\text{Neo}^r$ ,  $\text{Puro}^r$ ) を除去した

US hEPO 遺伝子導入 ES 細胞株取得のため、pCAGGS-Cre ベクター (Sunaga ら、Mol Reprod Dev., 46:109-113, 1997) を確立されている方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) に従って PL hEPO マウス ES 細胞へ導入する。

PL hEPO マウス ES 細胞の培養法は、記載の方法 (相沢慎一、前記) に従い、栄養細胞はマイトマイシン C (米国シグマ) 処理した G418 耐性初代培養細胞 (日本国インビトロジェン社より購入) を用いた。まず、増殖させた PL hEPO マウス ES 細胞をトリプシン処理し、 $3 \times 10^7$  個/ml となるように HBS に懸濁してから、0.5ml の細胞懸濁液を  $10 \mu\text{g}$  のベクターDNA と混和し、ジーンパルサーキュベット (電極距離: 0.4cm、米国バイオラッド) にてエレクトロポレーションを行った (容量: 960  $\mu\text{F}$ 、電圧: 250V、室温)。エレクトロポレーションした細胞を 10ml の ES 培地 (相沢慎一、前記) に懸濁し、それより 2.5ml 分を、あらかじめフィーダー細胞を播種した 60mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。30 時間後に ES 細胞 1000 個をあらかじめフィーダー細胞を播種した 100mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン、米国ベクトン・ディッキンソン) 1 枚に播種した。6 日後に生じたコロニーをピックアップし、それぞれを 24 穴プレートでコンフルーエントになるまで増殖させ、その 2/3 を 0.2ml の保存用培地 (FBS+10%DMSO、米国シグマ) に懸濁し、-80°C にて保存した。残りの 1/3 は 12 穴ゼラチンコートプレートに播種し、2 日間培養して  $10^6$ ~ $10^7$  個の細胞からゲノム DNA を Puregene DNA Isolation Kits (米国 Gentra System 社) により調製した。これらマウス ES 細胞ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI (日本国宝酒造) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した。続いてサザンプロットを行い、WO 00/10383 号パンフレット (実施例 48 参照) に記載の発明で使用された、Ig 軽鎖 J $\kappa$ -C $\kappa$  ゲノム DNA の 3' 端の DNA 断片 (XhoI~EcoRI、約 1.4kb、WO 00/10383 号パンフレット、特に図 25) をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Puro<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド (15.6 K と 12.7 K) が検出され、Puro<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド (15.6 K と 9.8 K) が検出された (図 25)。また、上記と同様の操作で得

られたサザンプロット膜を用い、実施例 10 で用いられた 3' KO-probe をプローブとして LoxP 配列で挟まれた Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株を検出した。Neo<sup>r</sup> 遺伝子を保持した ES 細胞では EcoRI 消化により、2 本のバンド (7.4 K と 5.7 K) が検出され、Neo<sup>r</sup> 遺伝子のみが除去された ES 細胞株では EcoRI 消化により、2 本のバンド (5.7 K と 4.4 K) が検出された (図 25)。これらの結果から、PL hEPO マウス ES 細胞株より 2 種の薬剤耐性遺伝子 (Neo<sup>r</sup>, Puro<sup>r</sup>) が同時に除去された ES 細胞株 (US hEPO マウス ES 細胞株) が得られた。

### 実施例 5 6

US hEPO マウス ES 細胞株および B リンパ球欠損マウス系統由来宿主胚を用いたキメラマウスの作製

免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトのホモ接合体においては、機能的な B リンパ球が欠損し、抗体が産生されない (Kitamura ら, Nature, 350:423-426, 1991)。清浄な環境で飼育した上記ホモ接合体の雌雄個体の交配により得られる胚を本実施例で行うキメラマウス作製の際の宿主として利用した。この場合、キメラマウスにおいて機能的な B リンパ球は、大部分が注入した ES 細胞に由来する。本実施例では富塚らの報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000) に記載された免疫グロブリン  $\mu$  鎮遺伝子ノックアウトマウスについて MCH (ICR) (日本国日本クレア社) 系統への戻し交配を 3 回以上行った個体を宿主胚調製用として用いた。

上記実施例 5 5 で得られ、免疫グロブリン  $\kappa$  鎮遺伝子下流にヒト EPO-cDNA が挿入されていることが確認された US hEPO マウス ES 細胞株を凍結ストックより立ち上げ、それらを、上記免疫グロブリン  $\mu$  鎮ノックアウトマウスホモ接合体の雌雄マウスの交配により得られた 8 細胞期胚に、それぞれ胚 1 つあたり 8 ~ 10 個注入した。ES 培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、1995、羊土社、日本国) で一晩培養して胚盤胞まで発生させた後、偽妊娠処理後 2.5 日の仮親 MCH (ICR) マウス (日本国日本クレア社) の子宮に、片側の子宮あたりそれぞれ約 10 個のインジェクション胚を移植した。実施例 5 5 の US hEPO マウス ES 細胞株を用いて作製されたインジェクション胚を移植した結果、

子キメラマウスが誕生した。キメラ個体は、毛色において、宿主胚由来の白色の中にES細胞由来の野生色（濃茶）が認められるかどうかによって判定される。誕生した子キメラマウスのうち毛色に明らかに野生色の部分のある、すなわちES細胞の貢献の認められる個体が得られる。これらの結果より、免疫グロブリンκ鎖遺伝子下流にヒトEPO-cDNAが挿入されているUS hEPOマウスES細胞株はキメラ形成能を保持している、すなわちマウス個体の正常組織に分化する能力を保持していることが示される。

### 実施例 5 7

CL hEPOマウスES細胞由来キメラマウス、NL hEPOマウスES細胞由来キメラマウス、PL hEPOマウスES細胞由来キメラマウスにおける、ヒトEPO遺伝子転写レベルの比較

#### （1）キメラマウス脾臓よりmRNAサンプルの調製

コントロールとして上記実施例1 1で作製されたRSエレメント・ターゲティング・マウスES細胞株由来のキメラマウス、上記実施例4 2で作製されたCL hEPOマウスES細胞由来キメラマウス、上記実施例4 6で作製されたNL hEPOマウスES細胞由来キメラマウス、上記実施例5 0で作製されたPL hEPOマウスES細胞由来キメラマウスより、1週齢、2週齢、4週齢それぞれで各群1匹より脾臓サンプルを摘出し、その直後に脾臓約50mgを液体窒素で凍結する。得られた各凍結サンプルにISOGEN（日本ジーン）1mlを加え、ホモジナイザーを用いてサンプルを破碎後、添付されたマニュアルに従いRNAを抽出する。得られたRNAサンプルに37°C、15分間、DNase処理（WAKO Deoxyribonuclease RT grade）を行った。更に、RNasy Mini（QIAGEN）を用いて、精製RNAサンプルを取得する。

#### ヒトEPO遺伝子転写レベルの比較：

SuperScriptIII（Invitrogen）を用い、得られた精製RNAサンプル250ngよりcDNAを合成した。その後、37°C、20分間RNase処理を行い、滅菌水による10倍希釈液2.0μlをその後のPCRに用いる。

ヒトEPO遺伝子発現確認用プライマーとして、以下のオリゴDNAを合成した。  
hEPO-RT FW5: GGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTC（配列番号61）

CkpolyAR2: CGCTTGTGGGGAAAGCCTCCAAGACC (配列番号 6 2)

ヒト EPO 遺伝子発現を確認するための PCR を以下のような条件で実施した。LA taq (日本国宝酒造) を用い、94°C、10秒インキュベート後68°C、1分間インキュベートの2段階反応を35サイクル行った。その結果、コントロール群では1週齢から4週齢全てで増幅バンドが検出されなかったが、ヒト EPO 遺伝子が導入されたマウス ES 細胞を用いて作製された全てのキメラマウスの脾臓組織では、1週齢から増幅バンドが検出された。NL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスと PL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスの増幅バンド濃度は2週齢、4週齢とほぼ等しく、CL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスの増幅バンド濃度はこれらと比較するとやや低いことが確認される。

また、各サンプル群で用いられている mRNA 量に偏りが生じていないかを確認する為、マウス Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子発現確認用プライマーとして、以下のオリゴ DNA を合成した。

mGAPDH5: CACCATGGAGAAGGCCGGGCCAC (配列番号 6 3)

mGAPDH3: ATCATACTTGGCAGGTTCTCCAGG (配列番号 6 4)

マウス GAPDH 遺伝子発現を確認するため PCR を以下のような条件で実施した。LA taq (日本国宝酒造) を用い、(94°C、30秒) → (65°C、30秒) → (72°C、30秒) 3段階のインキュベート反応を25サイクル行った。その結果、全てのサンプルでマウス GAPDH の発現がほぼ等しいレベルで検出され、ヒト EPO 遺伝子発現確認用プライマーを用いて検出された各サンプル間のバンドの濃度差がキメラマウス脾臓組織におけるヒト EPO 遺伝子発現レベルの差を反映していることが示される。これらの結果から、ベクター構造が pCk loxPV タイプよりも、pNP loxPV や pPS loxPV タイプのほうが転写レベルで発現に有利であることが示され、上記実施例 5 および上実施例 3 2 の *in vitro*、*in vivo* 実験で得られた結果との相関も認められる。また、これらの結果は、ES 細胞ゲノムより薬剤耐性遺伝子 (Puro<sup>r</sup>) を選択的に除去するため両末端に付加された loxP 配列の配列構造を一部変更することが導入遺伝子の発現になんら影響を及ぼさないことを示唆している。

### 実施例 5 8

CL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NP loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、US hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスにおける、血清中ヒト EPO 濃度の比較

コントロールとして上記実施例 1 1 で作製された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株由来のキメラマウス、上記実施例 4 2 で作製された CL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 4 6 で作製された NL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 0 で作製された PL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 2 で作製された Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 4 で作製された NP loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 6 で作製された US hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスより 8 週齢の時点で眼窩採血し得られた血清中のヒト EPO 濃度を ELISA キット (Quantikine IVD In Vitro Diagnostic human Erythropoietin. R&D system) を用いて測定した。その結果、コントロールとして上記実施例 1 1 で作製された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株由来のキメラマウス由来の血清中ヒト EPO 濃度は全て検出限界 (12.5 pg/ml) 以下であったが、全てのヒト EPO 遺伝子導入キメラマウスでは有意な発現が認められた。また、CL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NP loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、US hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスの順に血清中ヒト EPO 濃度の増加が認められる。

これらの結果はベクター構造が pCk loxPV タイプ、pNP loxPV タイプ、pUS タイプの順番にキメラマウス血中のヒト EPO 量が増加することを示し、薬剤耐性遺伝子 (Puro<sup>r</sup>) を選択的に除去するため両末端に付加された loxP 配列の配列構造が一部変更されたにも係わらず、上記実施例 6 の *in vitro* で得られた結果や上記実施例 3 3 の *in vivo* で得られた結果との相関が認められる。実施例 6 の結果との相関が認められたことから、ミエローマ細胞を用いた *in vitro* アッセイ系によつて、本発現システムを用いて作製されるキメラマウス血清中の導入遺伝子発現量

が推測されうることが示される。また、CL hEPO マウス ES 細胞より薬剤耐性遺伝子を除去 (Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞) することによっても、血清中ヒト EPO 濃度が増加することが示される。更に NL hEPO や PL hEPO マウス ES 細胞より薬剤耐性遺伝子を除去した ES 細胞を用いキメラマウスを作製した場合、その血清中濃度はそれぞれ単独の操作で得られた増加量に比べ相乗的に増加し、極めて興味深い結果が得られる。すなわち、用いる Ig κ プロモーター領域の変更と導入遺伝子固有のリーダー配列コード領域からイントロン領域を含む Ig κ 由来のリーダー配列コード領域への変更ないし導入遺伝子の近傍に位置する薬剤耐性遺伝子の除去操作はそれぞれ単独であってもキメラマウスにおける導入遺伝子発現量の向上に有用であることを示しているが、更に用いる Ig κ プロモーター領域の変更と導入遺伝子固有のリーダー配列コード領域からイントロン領域を含む Ig κ 由来のリーダー配列コード領域への変更及び導入遺伝子の近傍に位置する薬剤耐性遺伝子の除去操作を全て行うことによって、キメラマウスにおける導入遺伝子発現量がそれぞれ単独の操作によって向上した発現量に比べ相乗的に向上することを示し、本発明に記載された方法が遺伝子およびその産物の生体内における機能解析に極めて有用であることを示している。

### 実施例 5 9

CL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、PL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、NP loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、US hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウスにおける末梢血血球解析

コントロールとして上記実施例 1 1 で作製された RS エレメント・ターゲティング・マウス ES 細胞株由来のキメラマウス、上記実施例 4 2 で作製された CL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 4 6 で作製された NL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 0 で作製された PL hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 2 で作製された Ck loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 4 で作製された NP loxPV hEPO マウス ES 細胞由来キメラマウス、上記実施例 5 6 で作製された US hEPO マウス ES 細胞由来キメラマ

ウスより 8 週齢の時点で眼窩採血し、血球測定装置 (Bayer Medical (株) 製、ADVIA 120 HEMATOLOGY SYSTEM) を用いて末梢血血球解析を実施した。コントロールマウス群にくらべ、ヒト EPO 遺伝子が導入されたキメラマウスは上記全ての群において有意な赤血球数増加が認められる。しかしながら各群間の赤血球数には有意な差は認められない。また、コントロール群のヘマトクリット値は平均 58% であったが、ヒト EPO 遺伝子が導入されたキメラマウスは上記全ての群において有意な増加を示し、ヒト EPO 遺伝子導入により有意なヘマトクリット値の増加が認められる。しかしながら赤血球数と同様各群間に有意な差は認められない。上記実施例 5 8 の各群間で血清中ヒト EPO 濃度の有意な差が認められるにも係わらず、血球解析において有意な差が認められない理由として、最も発現量の少ない CL hEPO マウス ES 細胞より作製されたキメラマウスのヒト EPO 発現量においても既に増加の上限値に達していることが原因と考えられる。従って、本発明に記載された方法が遺伝子およびその産物の生体内における機能解析に有用であることを示している。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、本発明のキメラ非ヒト動物またはその子孫、あるいは該動物由來の細胞、組織またはハイブリドーマは、従来と比べて有意に高いレベル、例えば数百倍高いレベル、の外来 DNA 発現を可能にするため、所望蛋白質の高生産法として利用できるし、また機能未知の外来遺伝子が導入されたキメラ非ヒト動物またはその子孫を用いることによって、表現型の違いなどから、その遺伝子の生体内機能を解析するために利用することができる。

本明細書で引用された全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

#### 配列表フリー テキスト

配列番号 1 : プライマー

配列番号 2 : プライマー

配列番号 3 : プライマー

配列番号 4 : プライマー  
配列番号 5 : プライマー  
配列番号 6 : プライマー  
配列番号 7 : プライマー  
配列番号 8 : プライマー  
配列番号 9 : プライマー  
配列番号 10 : プライマー  
配列番号 11 : プライマー  
配列番号 12 : プライマー  
配列番号 13 : プライマー  
配列番号 14 : プライマー  
配列番号 15 : プライマー  
配列番号 16 : プライマー  
配列番号 17 : プライマー  
配列番号 18 : プライマー  
配列番号 19 : プライマー  
配列番号 20 : プライマー  
配列番号 21 : プライマー  
配列番号 22 : プライマー  
配列番号 23 : プライマー  
配列番号 24 : プライマー  
配列番号 25 : プライマー  
配列番号 26 : プライマー  
配列番号 27 : プライマー  
配列番号 28 : プライマー  
配列番号 29 : プライマー  
配列番号 30 : プライマー  
配列番号 31 : プライマー  
配列番号 32 : プライマー

配列番号 3 3 : プライマー  
配列番号 3 4 : プライマー  
配列番号 3 5 : プライマー  
配列番号 3 6 : プライマー  
配列番号 3 7 : プライマー  
配列番号 3 8 : プライマー  
配列番号 3 9 : プライマー  
配列番号 4 0 : プライマー  
配列番号 4 1 : プライマー  
配列番号 4 2 : プライマー  
配列番号 4 3 : プライマー  
配列番号 4 4 : プライマー  
配列番号 4 5 : プライマー  
配列番号 4 6 : プライマー  
配列番号 4 7 : リンカー  
配列番号 4 8 : リンカー  
配列番号 4 9 : リンカー  
配列番号 5 0 : リンカー  
配列番号 5 1 : リンカー  
配列番号 5 2 : リンカー  
配列番号 5 3 : リンカー  
配列番号 5 4 : リンカー  
配列番号 5 5 : プライマー  
配列番号 5 6 : プライマー  
配列番号 5 7 : プライマー  
配列番号 5 8 : プライマー  
配列番号 5 9 : リンカー  
配列番号 6 0 : リンカー  
配列番号 6 1 : プライマー

配列番号 6 2 : プライマー

配列番号 6 3 : プライマー

配列番号 6 4 : プライマー

## 請求の範囲

1. 特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の制御領域によって所望の蛋白質の発現が制御されるべく該所望の蛋白質をコードする外来 DNA を含む、非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞であって、該特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子由来のリーダー配列コード領域を含む核酸断片が該外来 DNA に結合されていることを特徴とする前記細胞。
2. 前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子が免疫グロブリン遺伝子である請求項 1 記載の細胞。
3. 前記免疫グロブリン遺伝子が免疫グロブリン軽鎖遺伝子である請求項 2 記載の細胞。
4. 前記核酸断片が、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターをさらに含む請求項 1 記載の細胞。
5. 前記核酸断片が、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーターとリーダー配列コード領域との間の 5' 非翻訳領域の一部もしくは全部をさらに含む請求項 4 記載の細胞。
6. 前記核酸断片が、前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子のプロモーター／5' 非翻訳領域の一部もしくは全部／リーダー配列コード領域を含む請求項 1 記載の細胞。
7. 前記核酸断片が、前記非ヒト動物由来の免疫グロブリン遺伝子のプロモーター／5' 非翻訳領域の一部もしくは全部／リーダー配列コード領域を含む請求項 6 記載の細胞。
8. 前記核酸断片の長さが 300 塩基対より大きい請求項 1 記載の細胞。
9. 前記所望の蛋白質をコードする外来 DNA の下流にポリ A シグナル領域をコードする配列が結合されている、請求項 1～8 のいずれか一項記載の細胞。
10. 前記分化多能性を有する細胞において前記外来 DNA のゲノムへの導入のために使用された 1 もしくは複数の薬剤耐性マーカー遺伝子が除去されている請求項 1 記載の細胞。
11. 前記特定の細胞および／または組織において発現する遺伝子の対立遺

伝子が不活性化されている請求項 1 記載の細胞。

1 2. 前記分化多能性を有する細胞が胚性幹（E S）細胞である請求項 1 記載の細胞。

1 3. 前記非ヒト動物がマウスである請求項 1 記載の細胞。

1 4. 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項記載の非ヒト動物由来の分化多能性を有する細胞を作製し、宿主胚に導入し、キメラ胚を得る工程、該キメラ胚を同種の仮親非ヒト動物に移植する工程、移植したのち得られた仔動物の中から、所望の蛋白質をコードする外来 DNA を発現するキメラ非ヒト動物を選抜する工程を含む、該所望の蛋白質をコードする外来 DNA を過剰発現するキメラ非ヒト動物の作製方法。

1 5. 前記キメラ非ヒト動物がマウスである請求項 1 4 記載の方法。

1 6. 前記分化多能性を有する細胞が E S 細胞である請求項 1 4 記載の方法。

1 7. 請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法によって作製された、かつ所望の蛋白質をコードする外来 DNA が過剰発現することを特徴とするキメラ非ヒト動物。

1 8. 請求項 1 7 記載のキメラ非ヒト動物同士、または該キメラ非ヒト動物とそれと同種の非ヒト動物、を交配することにより作製された、かつ所望の蛋白質をコードする外来 DNA が過剰発現することを特徴とする子孫非ヒト動物。

1 9. 請求項 1 7 記載のキメラ非ヒト動物または請求項 1 8 記載の子孫非ヒト動物、あるいは該動物由来の細胞、組織またはハイブリドーマのいずれかを用いて所望の外来 DNA を発現し、産生される該遺伝子によってコードされる蛋白質を回収することを含む、蛋白質の製造方法。

2 0. 請求項 1 7 記載のキメラ非ヒト動物または請求項 1 8 記載の子孫非ヒト動物の表現型を、所望の蛋白質をコードする外来 DNA を含まない対応の野生型非ヒト動物の表現型と比較し、それらの表現型の違いを決定することを含む、所望の蛋白質または所望の蛋白質をコードする DNA の生体内機能を解析する方法。

図 1

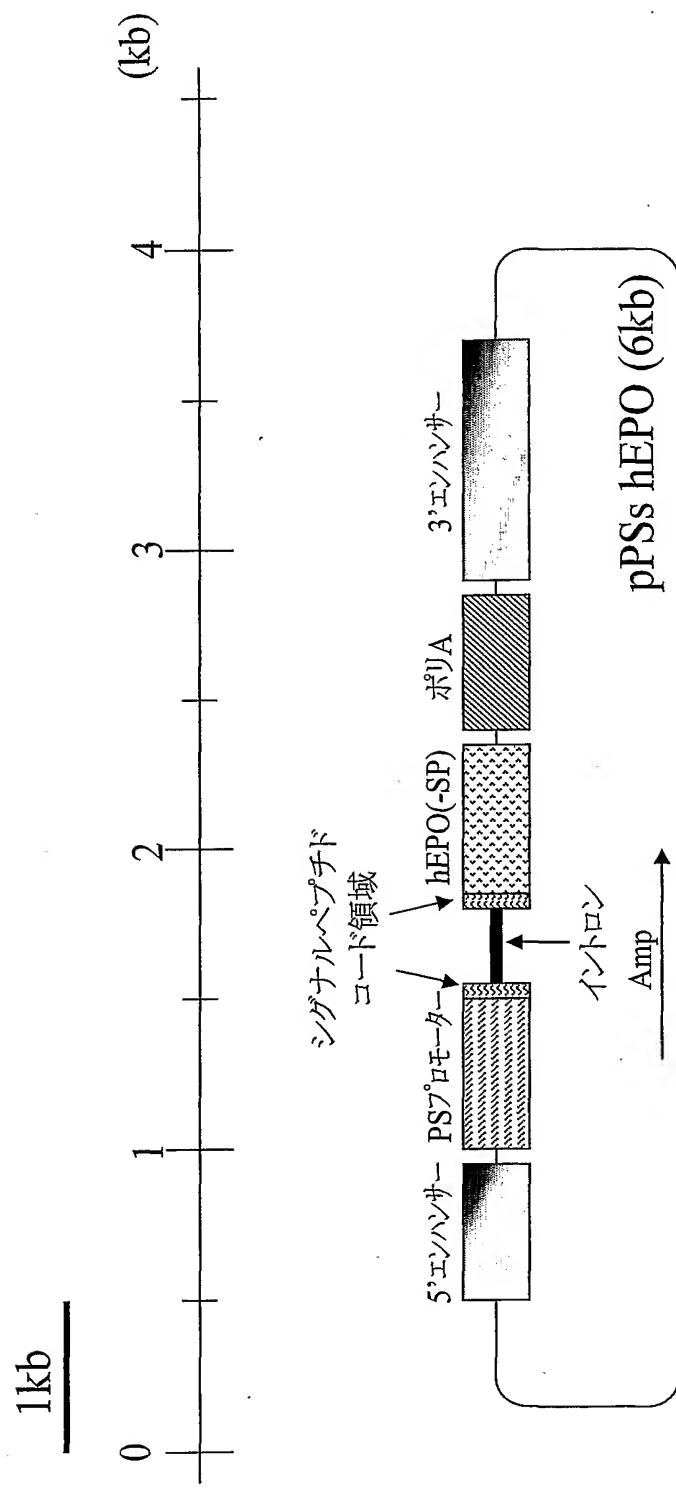


図 2

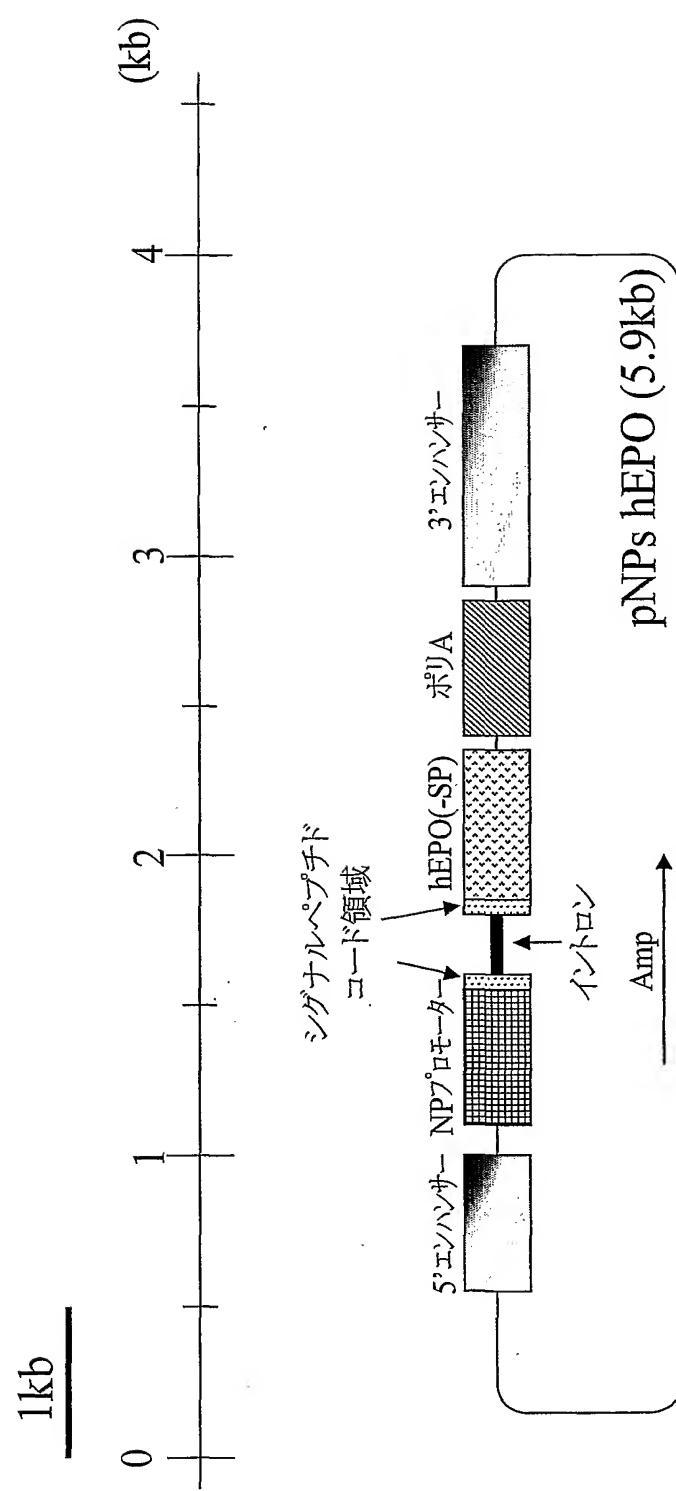


図3

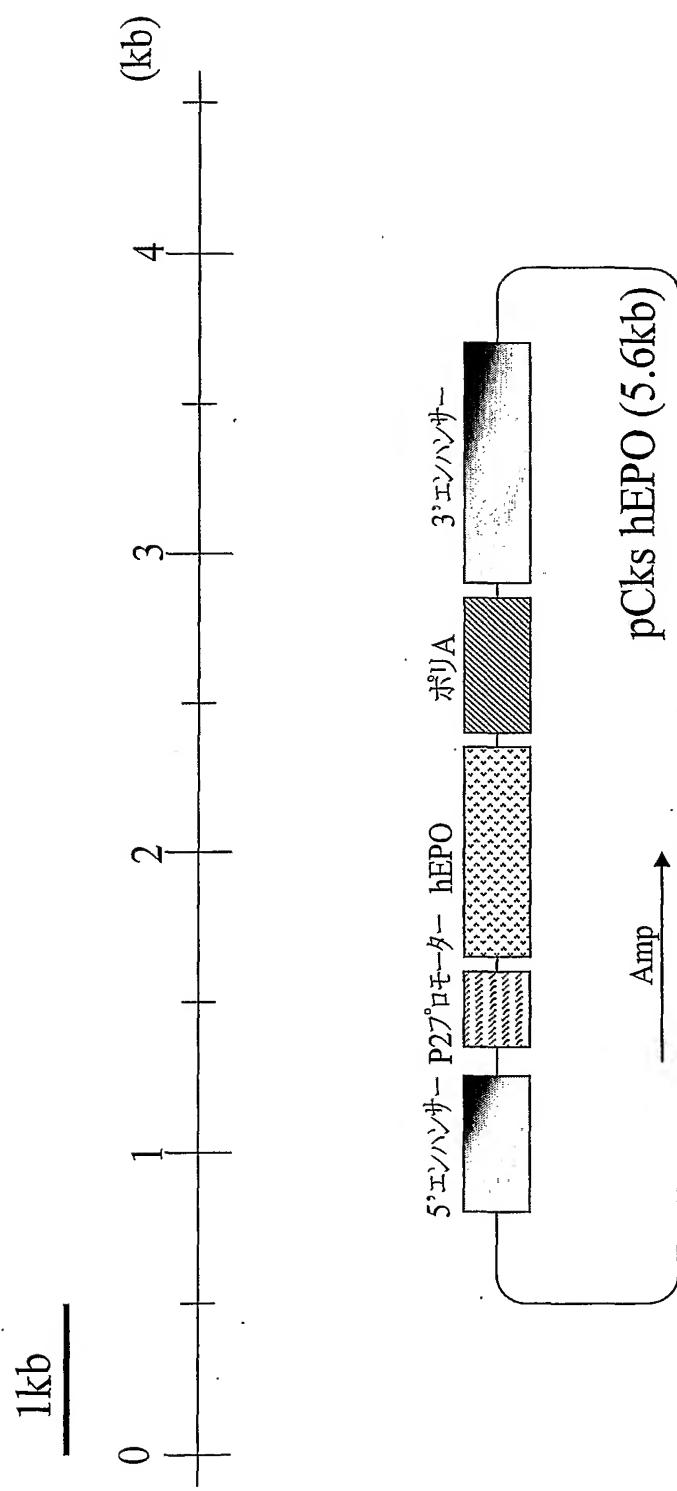


図 4

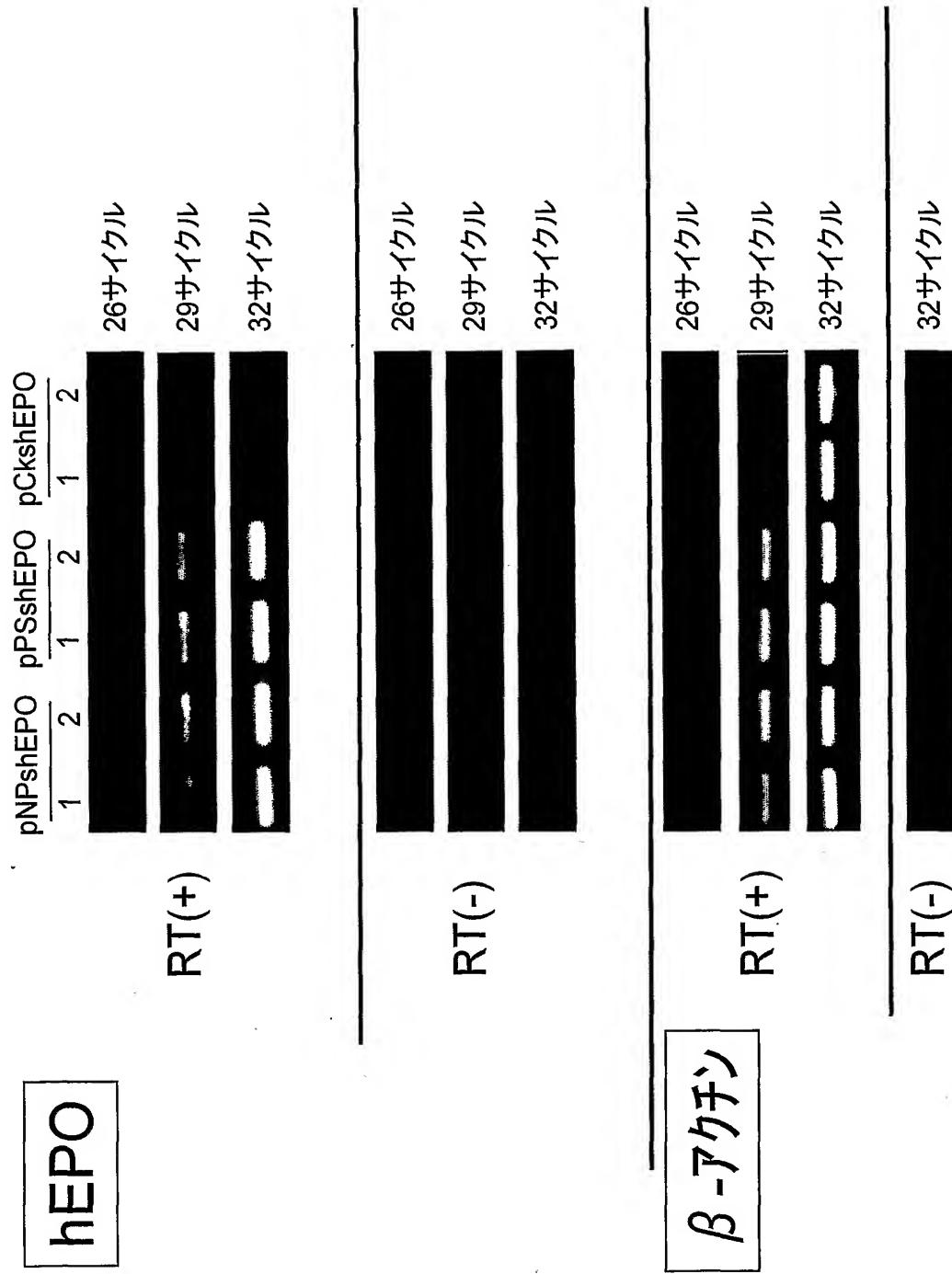
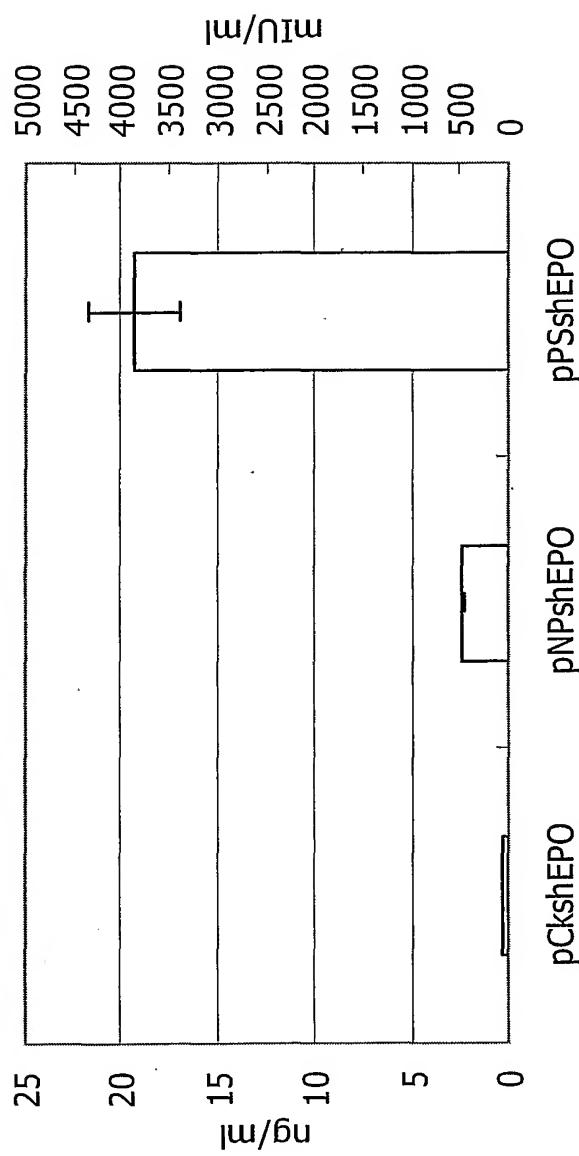


図 5

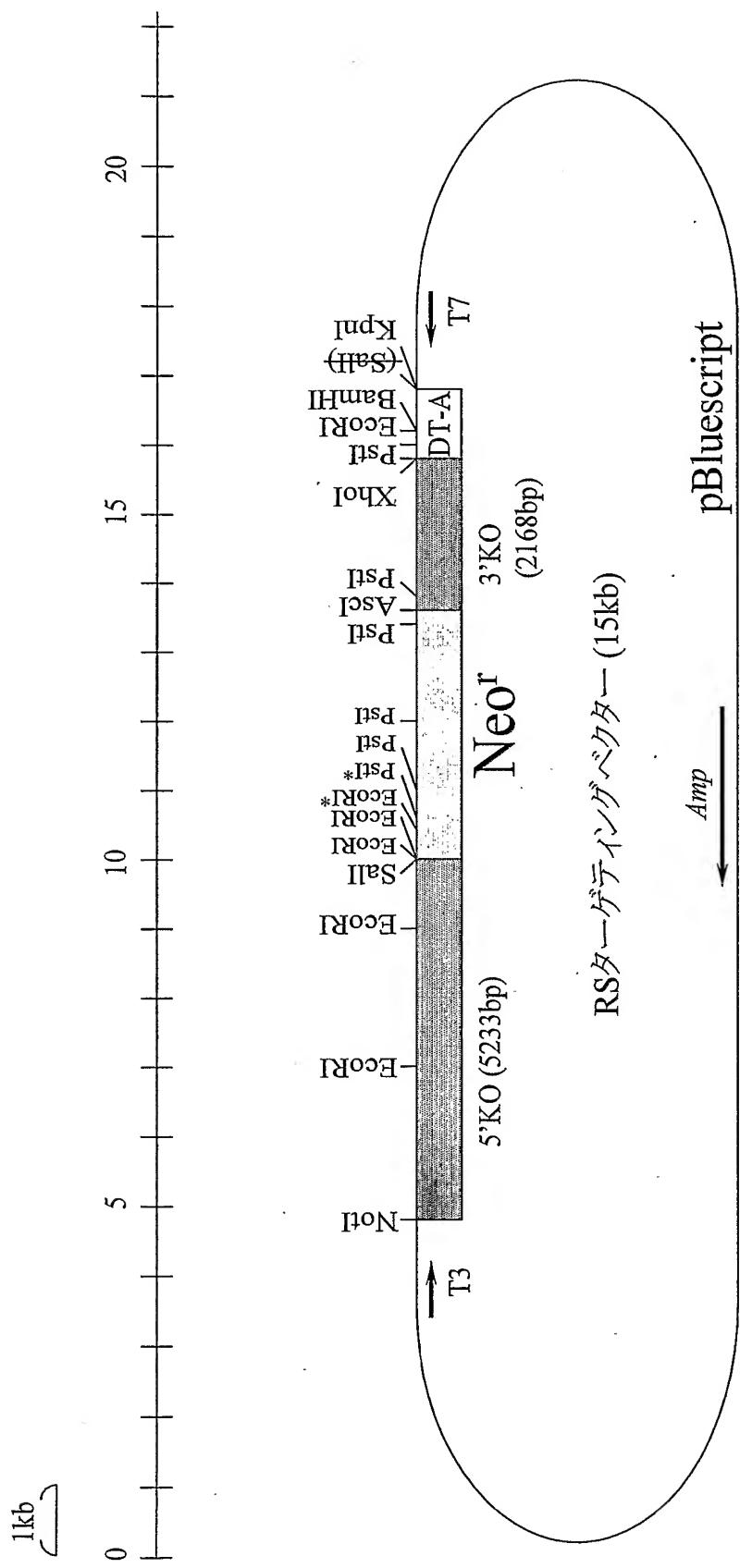
(A)



(B)

	平均値(ng/ml)
pCkshEPO	0.3 ng/ml (N=3)
pNPshEPO	2.4 ng/ml (N=2)
pPSShEPO	19.3 ng/ml (N=3)

6



7

(A)

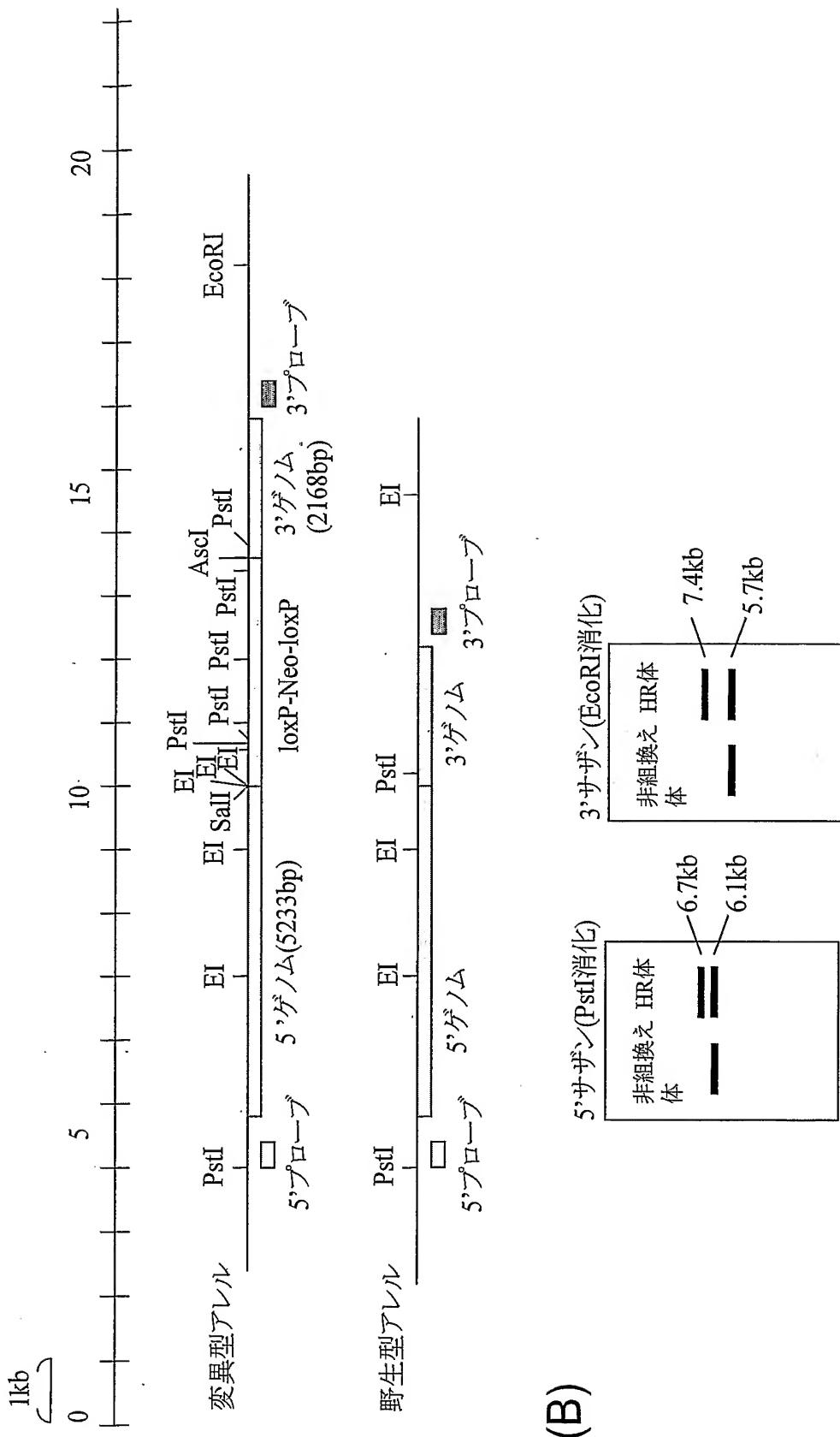


図 8

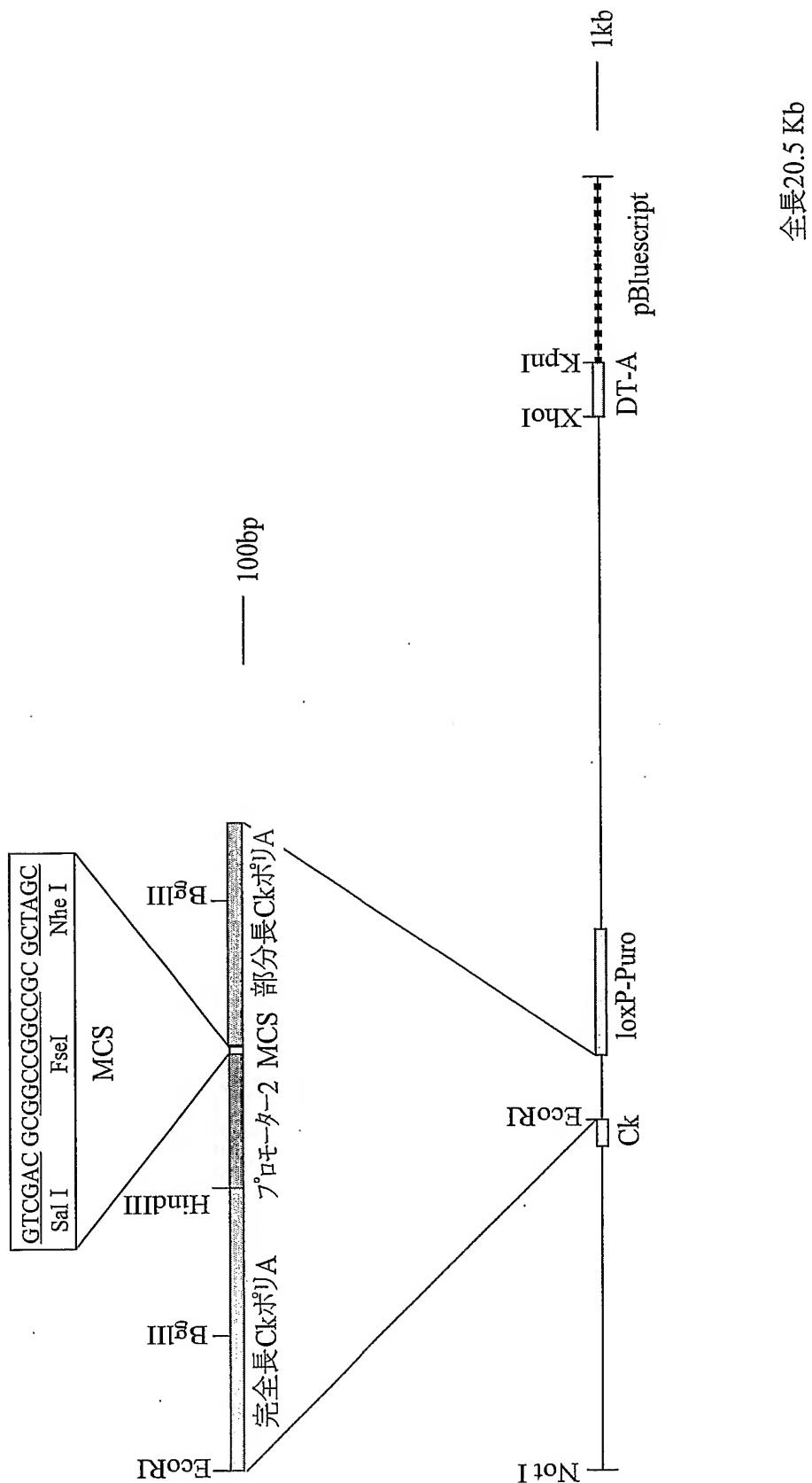
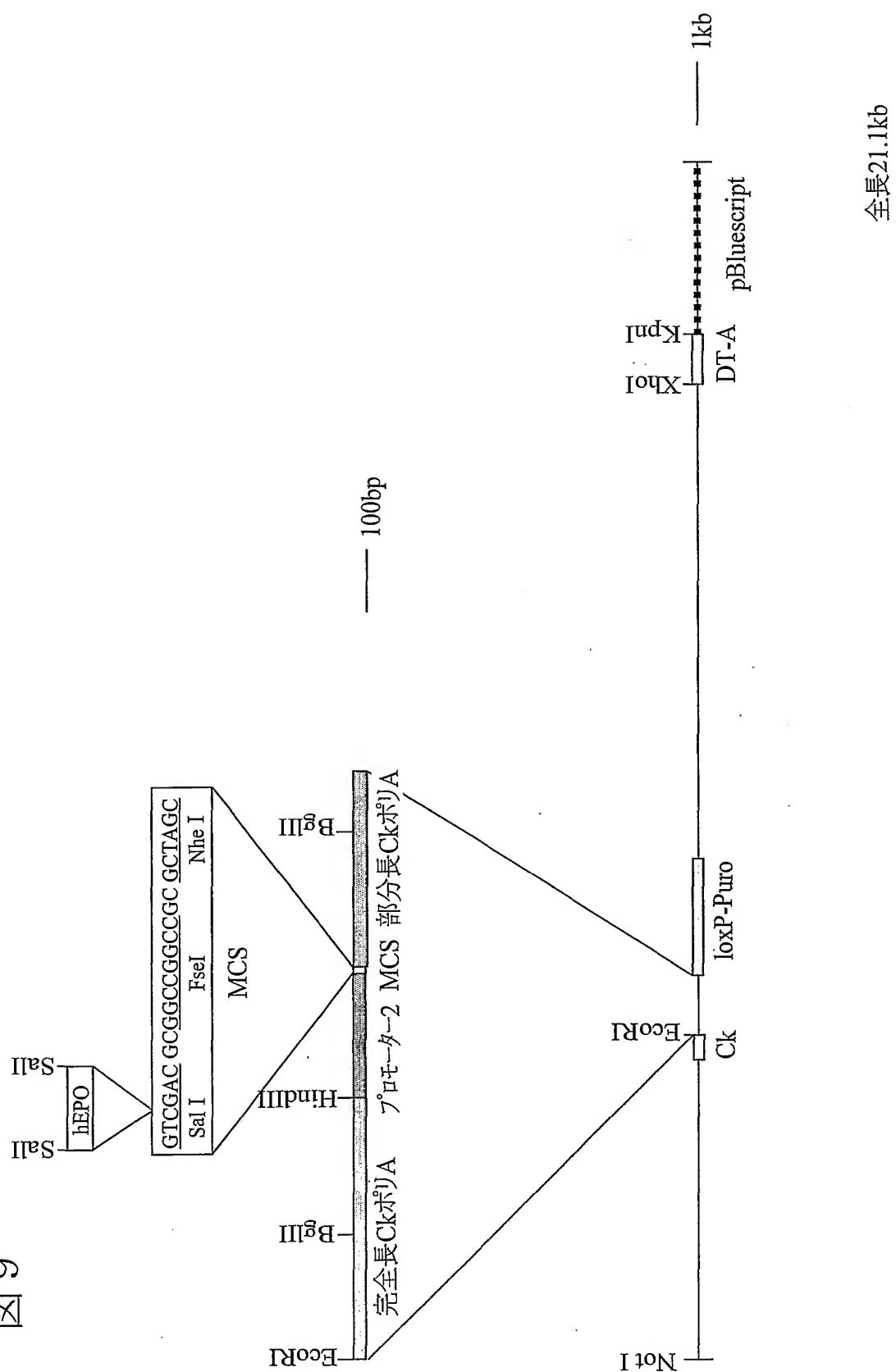
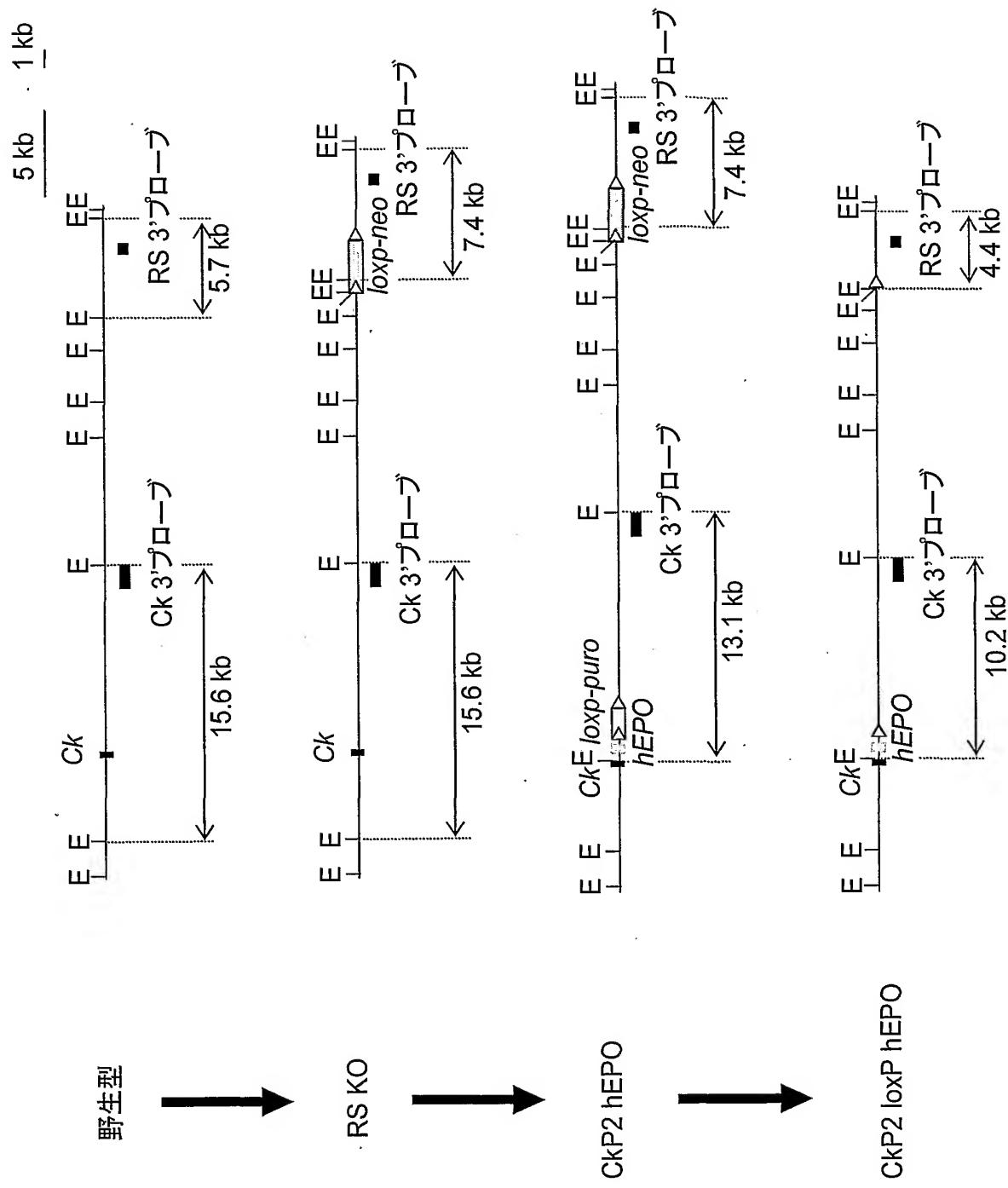


図9



## 図10



一  
一  
四

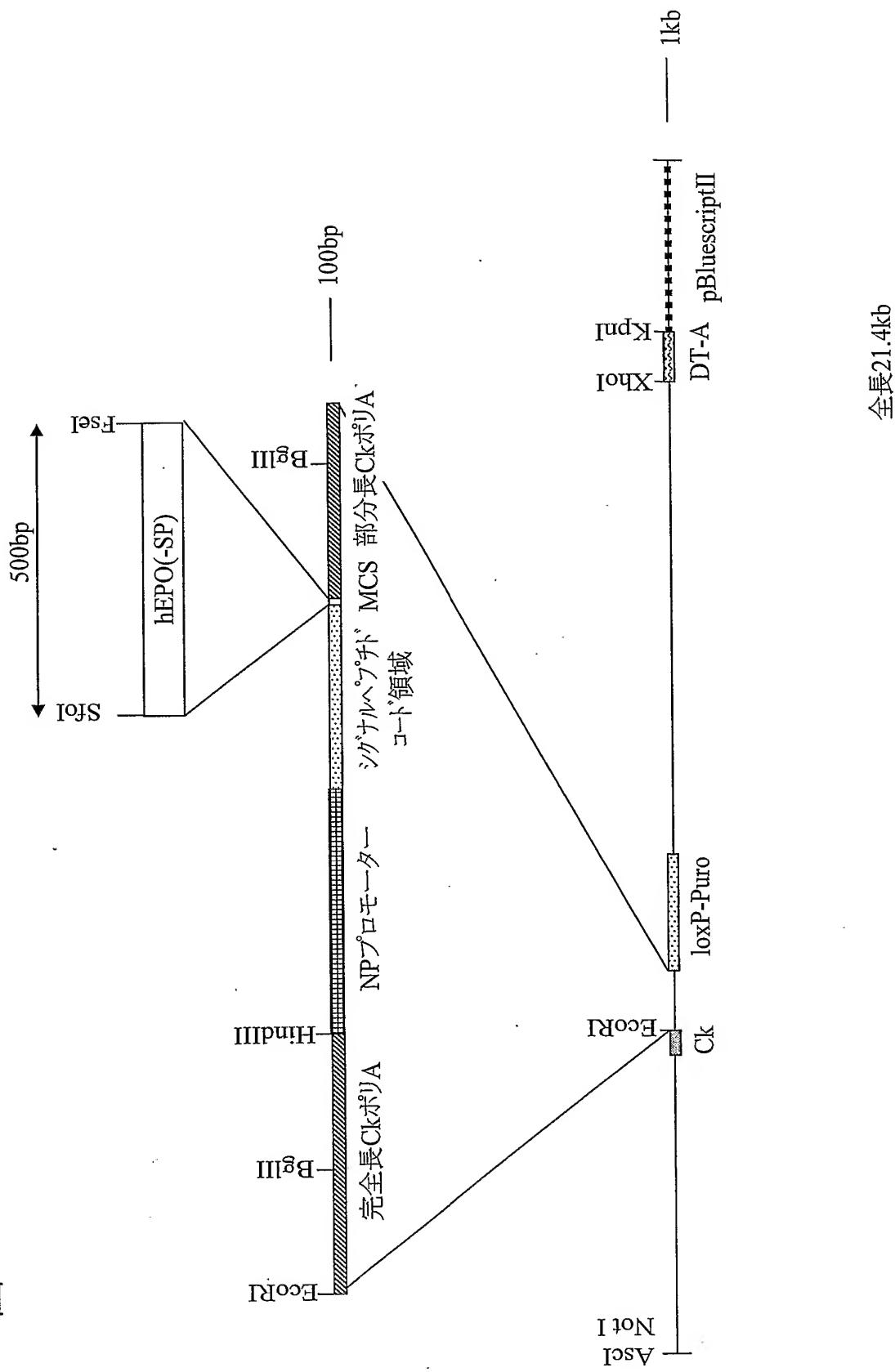


図 12

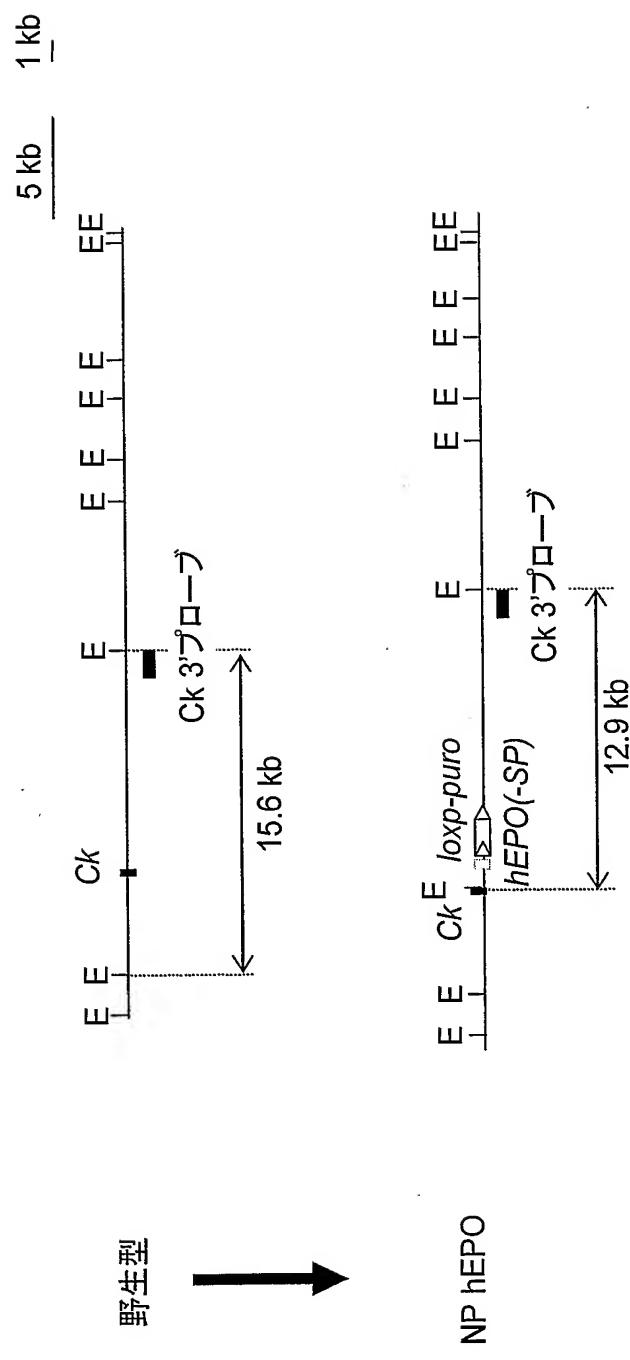


図 1 3

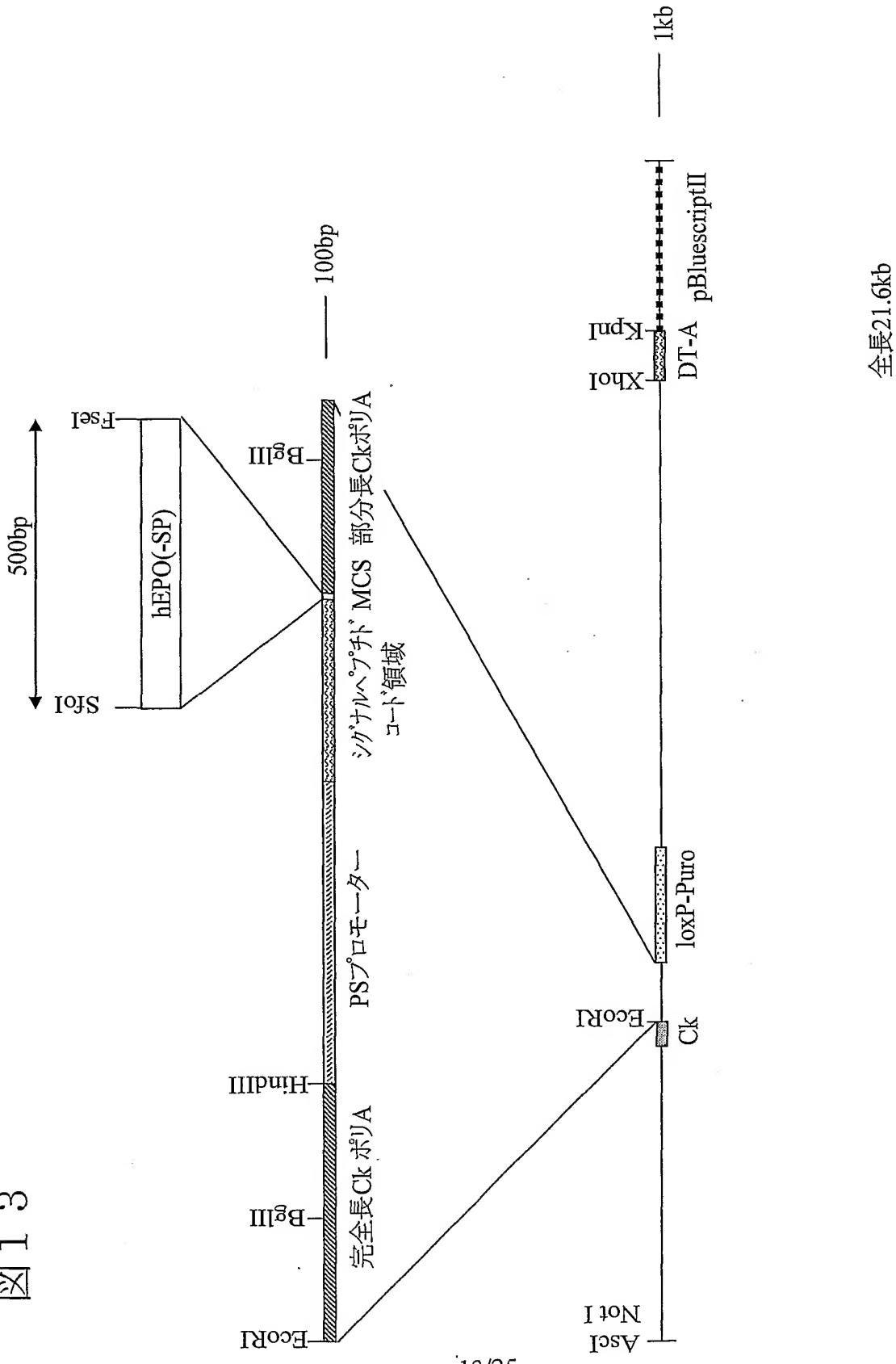


図 14

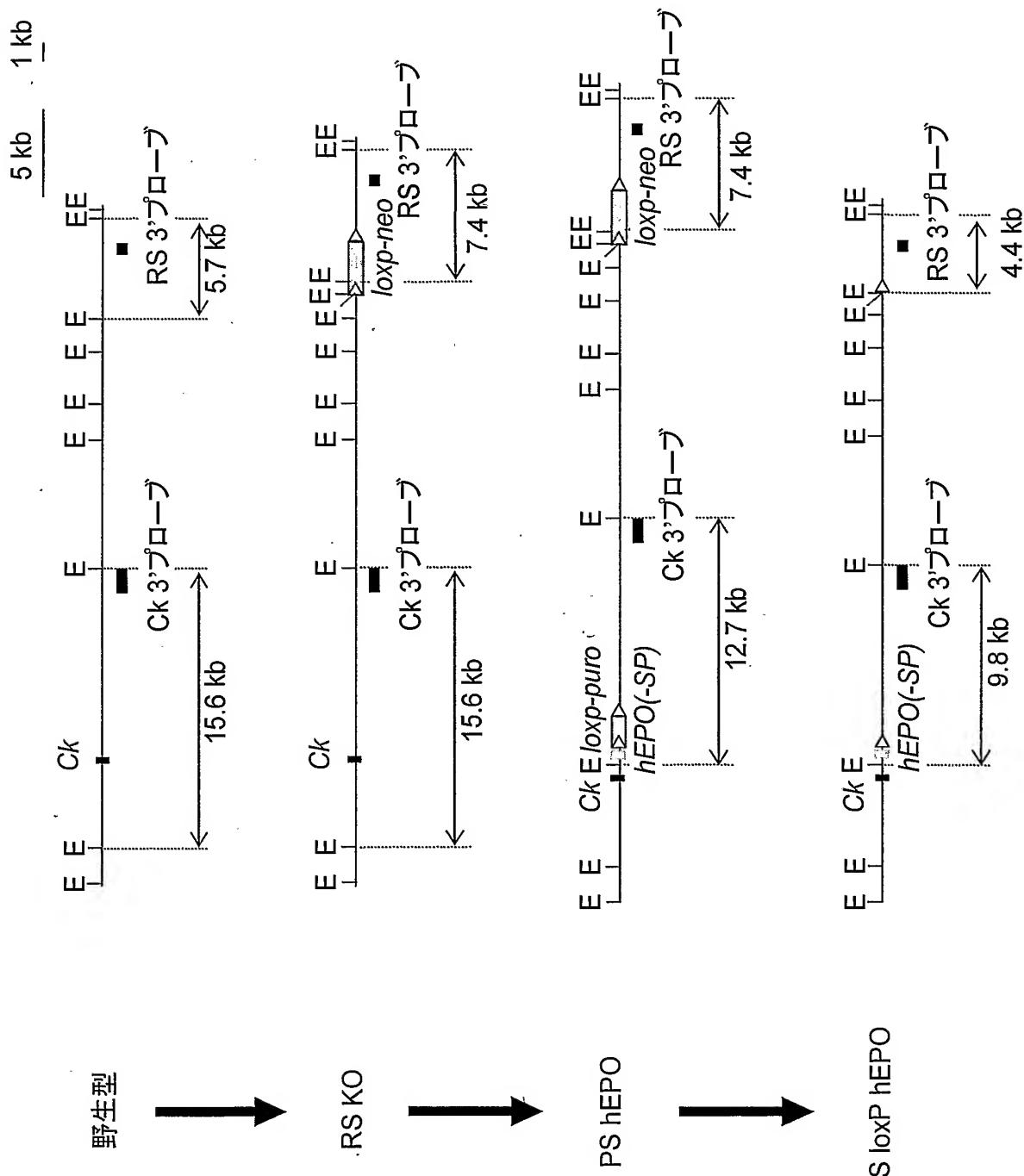


図15

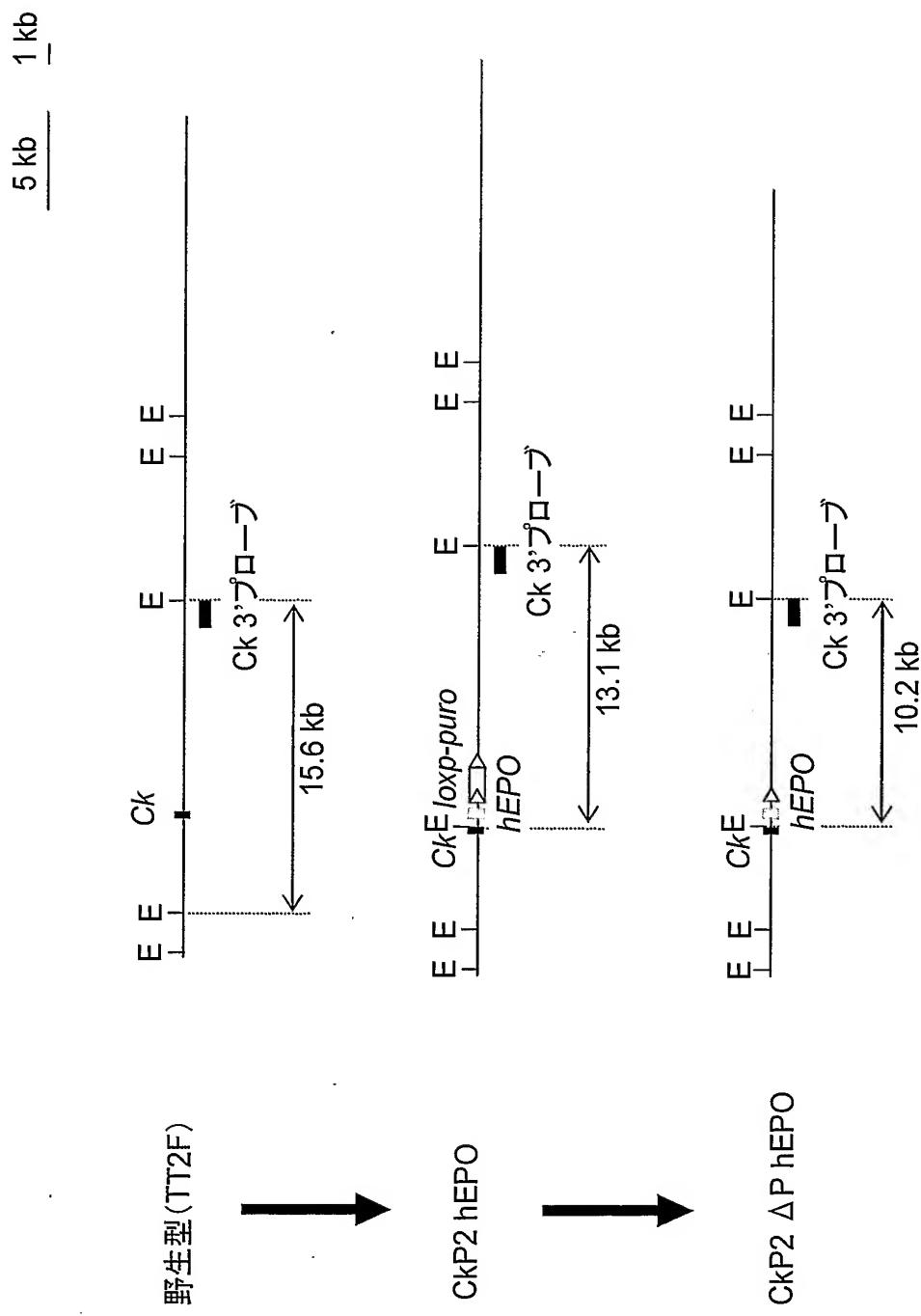


図 1 6

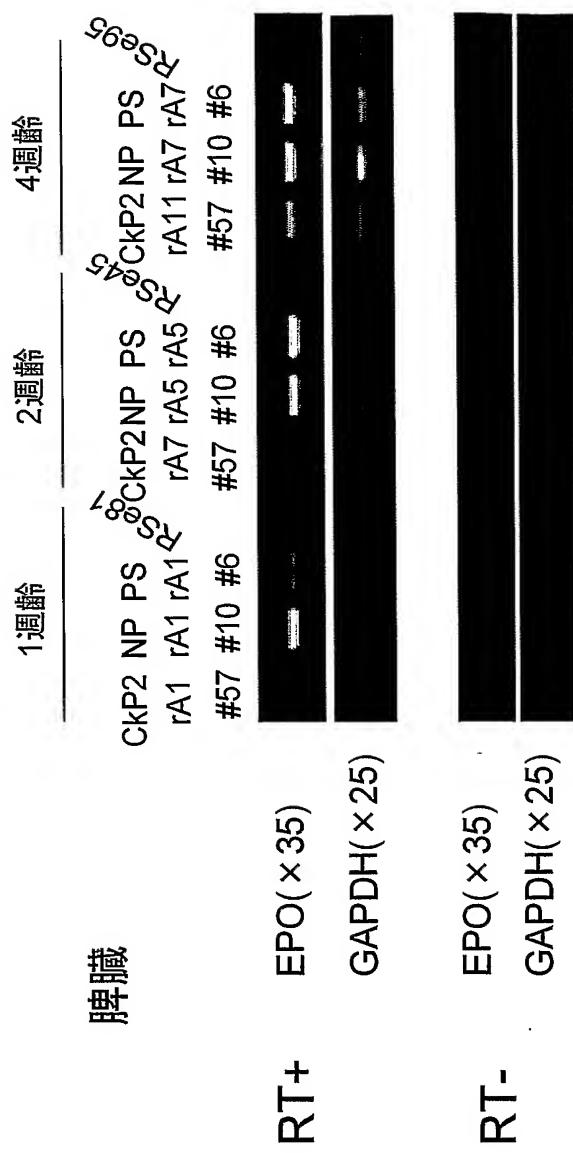
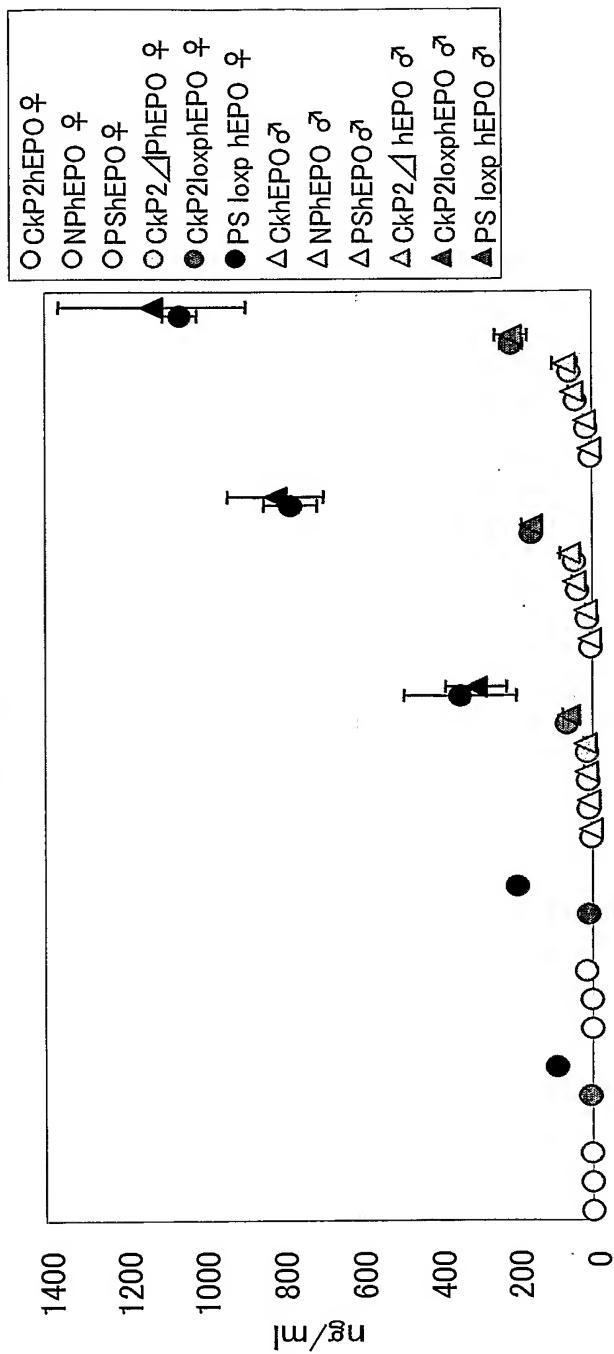


図 17

(A)

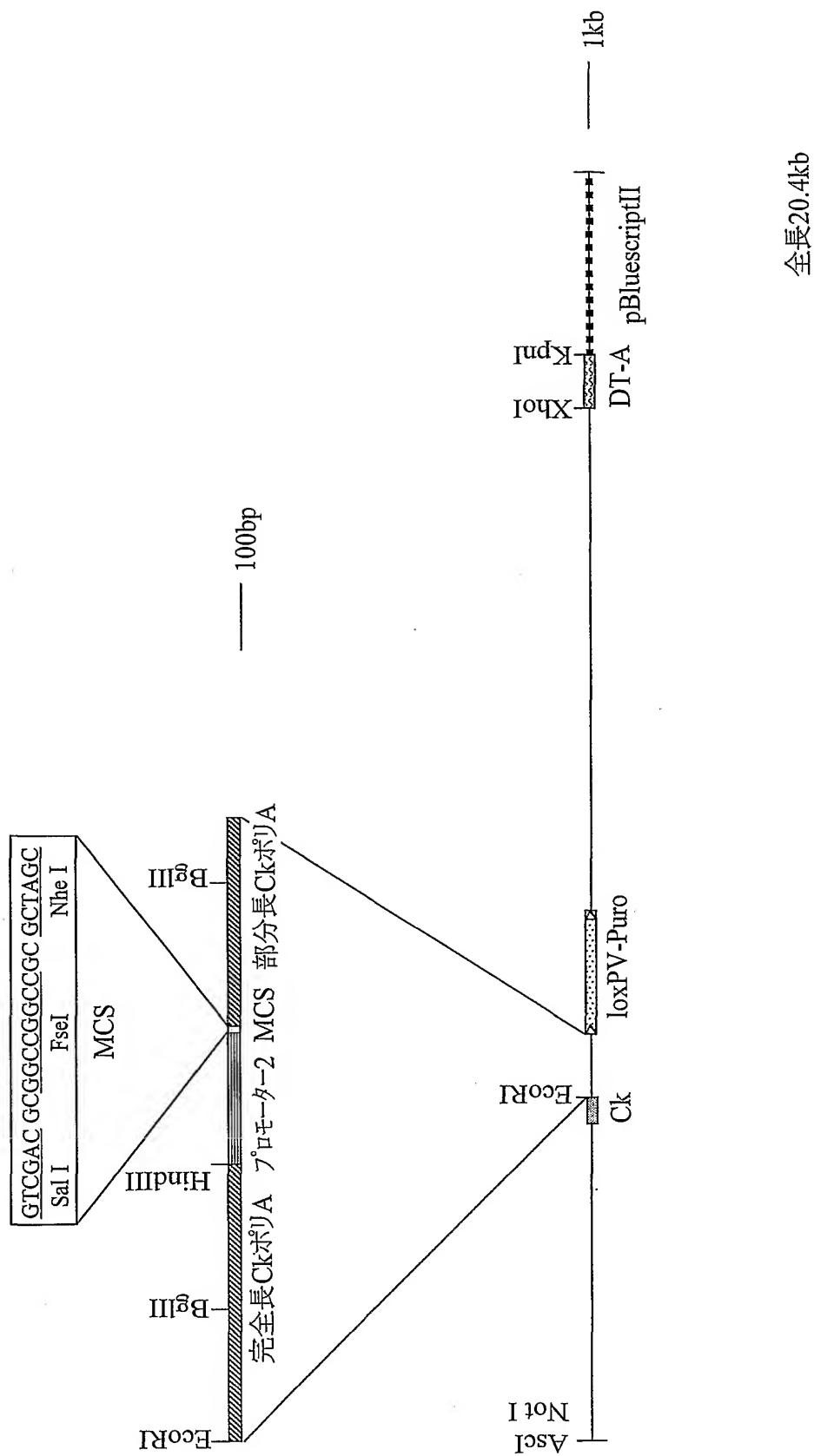
hEPO



(B)

	1週齢	2週齢	4週齢	6週齢	8週齢
CkP2hEPO ♀	0.3030±0.0720(2)	0.7361±0.0750(2)	3.079±0.568(5)	4.460±0.524(5)	4.356±0.608(5)
NPhEPO ♂	0.8257(1)	1.313(1)	10.11±1.72(6)	13.77±1.64(6)	14.86±2.28(6)
PShEPO ♀	2.484(1)	15.64(1)	9.378±0.513(2)	17.03±0.397(2)	19.38±2.61(2)
CkP2ΔPhEPO ♂	5.523±0.575(2)	10.08±0.127(2)	12.14±4.99(5)	37.58±11.7(5)	42.16±12.5(5)
CkP2 loxp hEPO ♂	91.08(1)	191.8(1)	14.78±7.30(5)	44.52±8.21(5)	50.66±9.40(5)
PS loxp hEPO ♂	0	0	14.28±4.90(5)	45.85±23.9(5)	57.80±27.8(5)
			18.90±4.31(4)	57.85±24.3(4)	68.94±32.0(4)
			65.05±16.1(10)	154.9±14.5(10)	205.2±29.2(10)
			59.68±16.0(10)	155.0±25.0(10)	206.6±41.0(10)
			338.0±144(5)	770.7±68.0(5)	1054±44.1(6)
			297.4±78.5(8)	808.8±123(8)	1126±241(7)

図 18



## 図 19

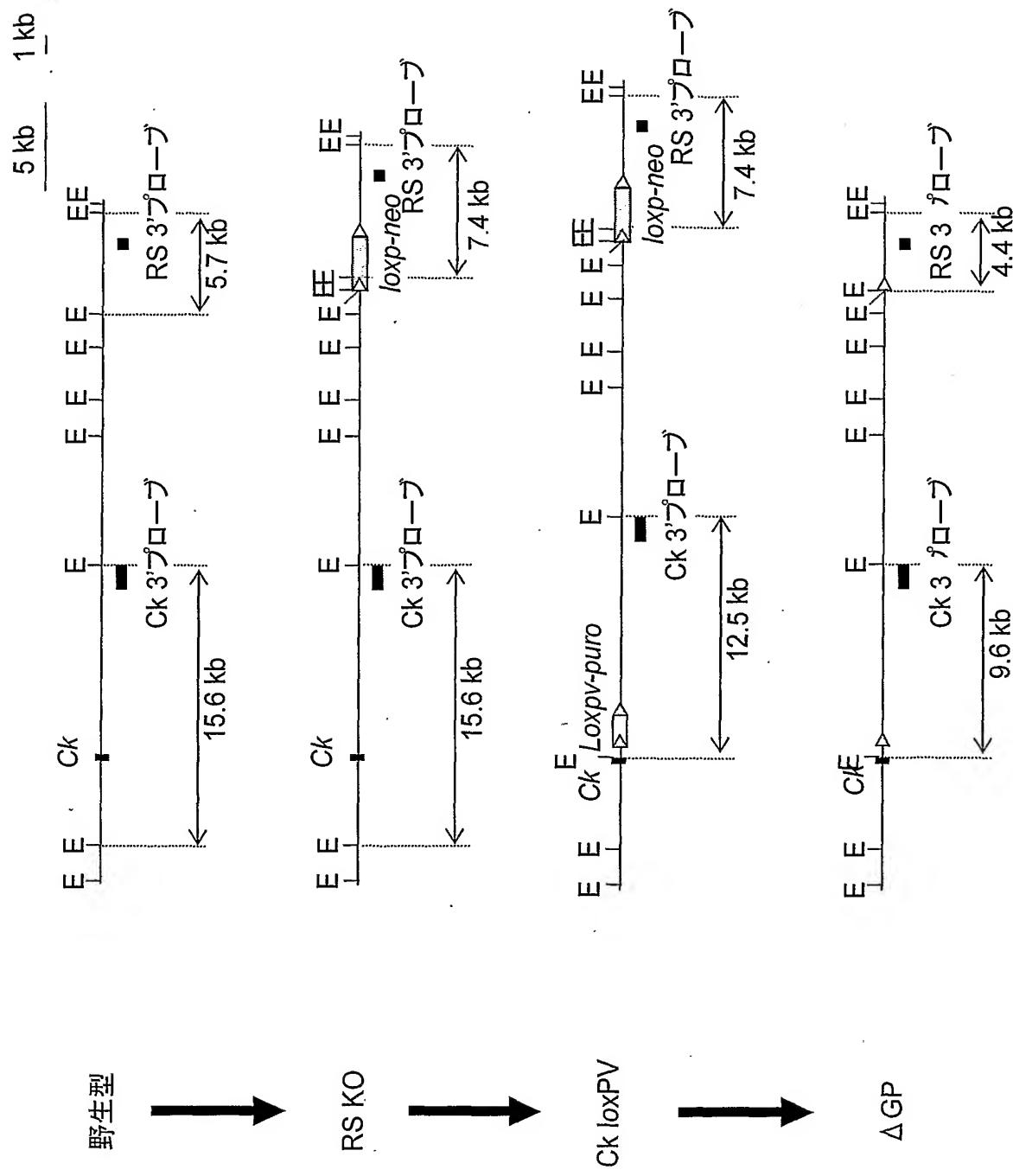


図20

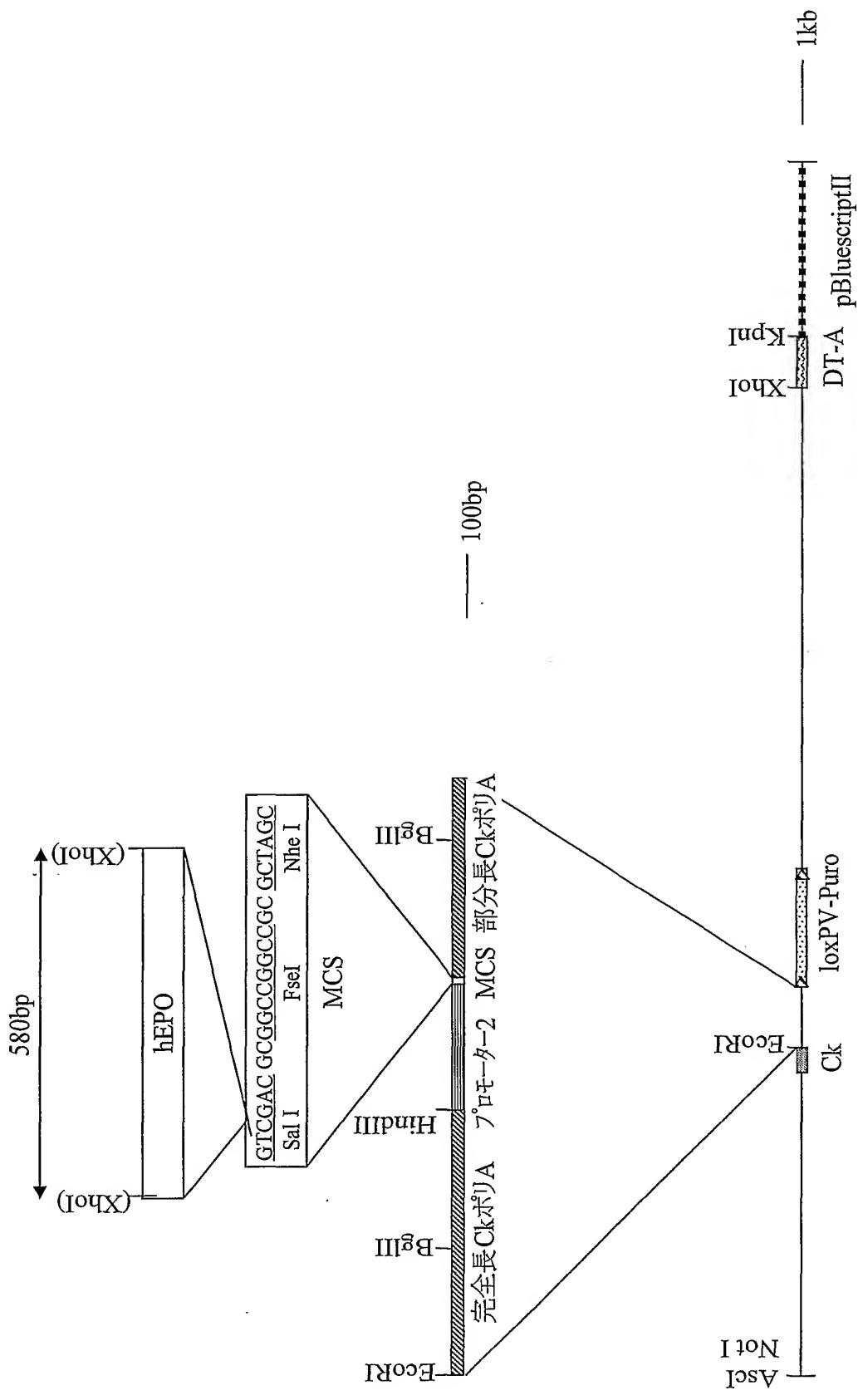
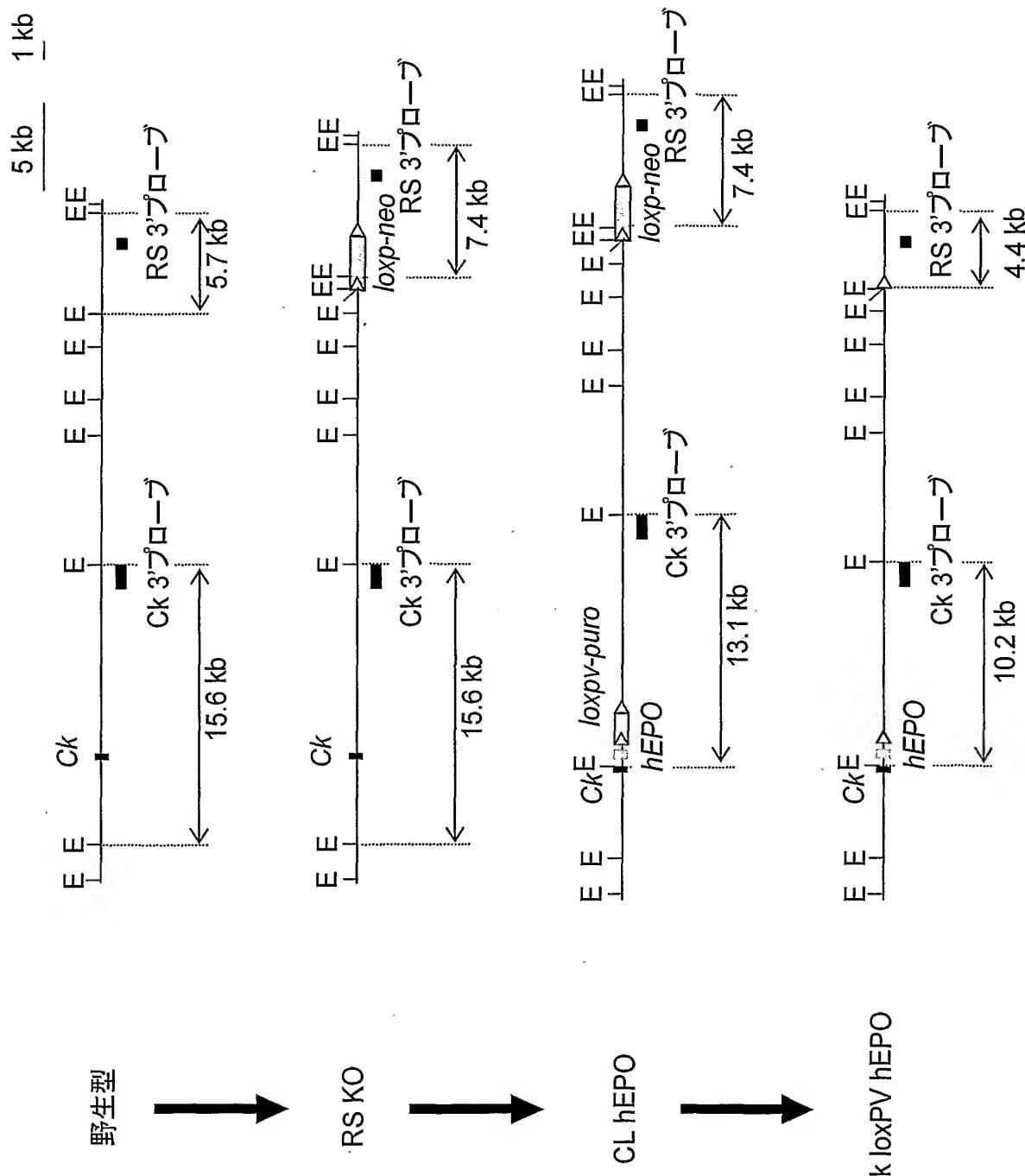


図 2 1



## 図 2 2

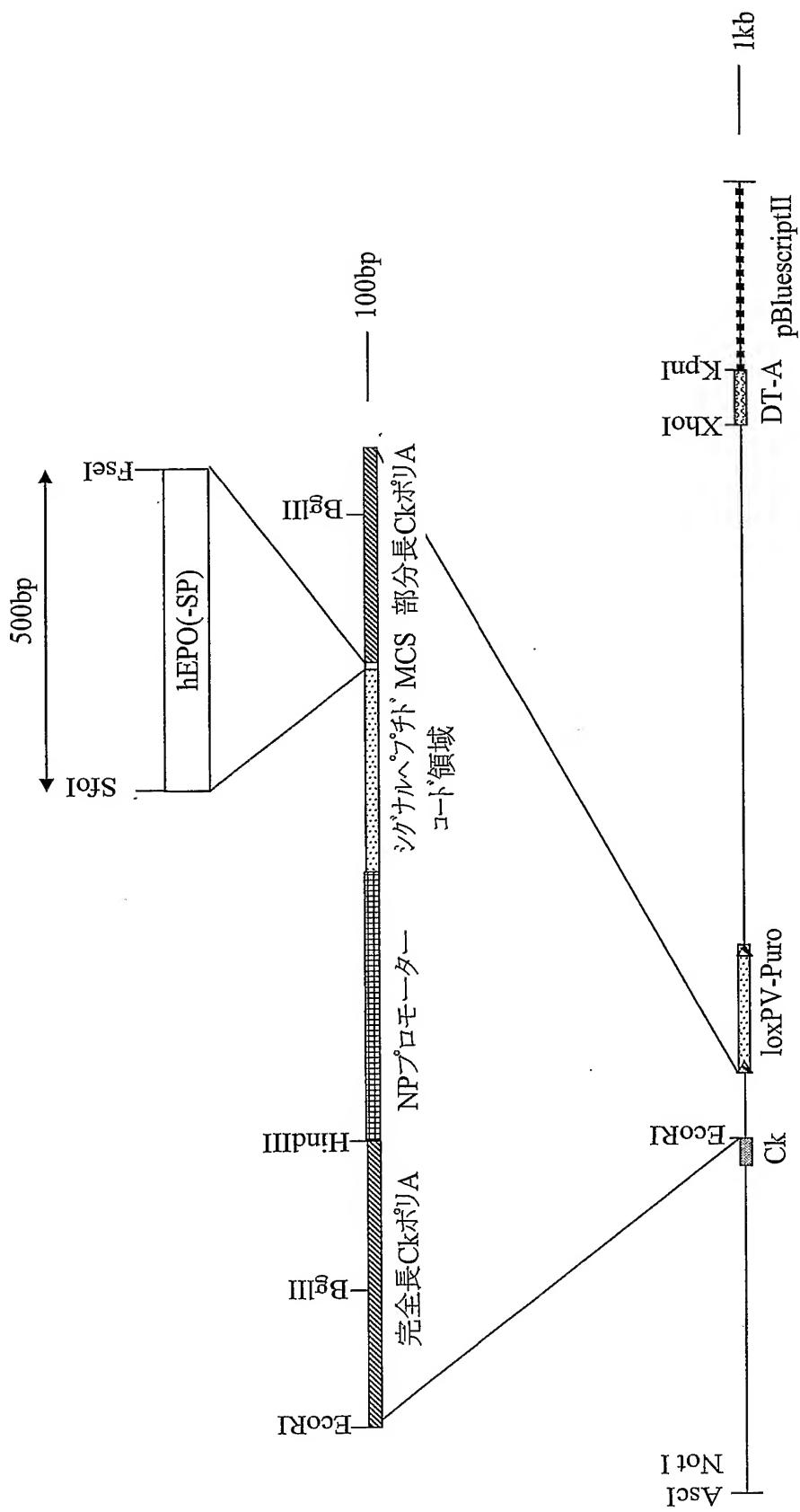


図 2 3

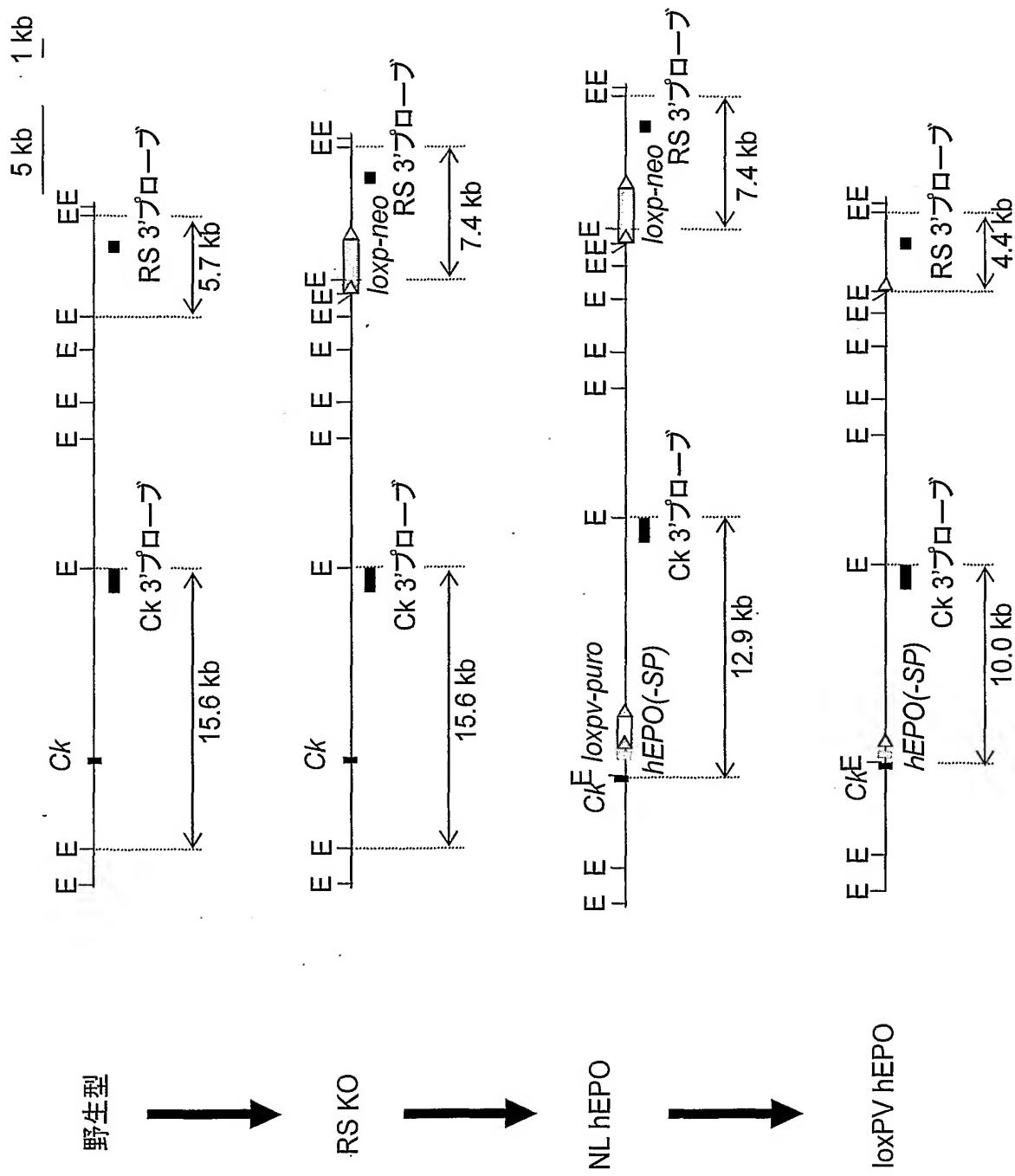


図 24

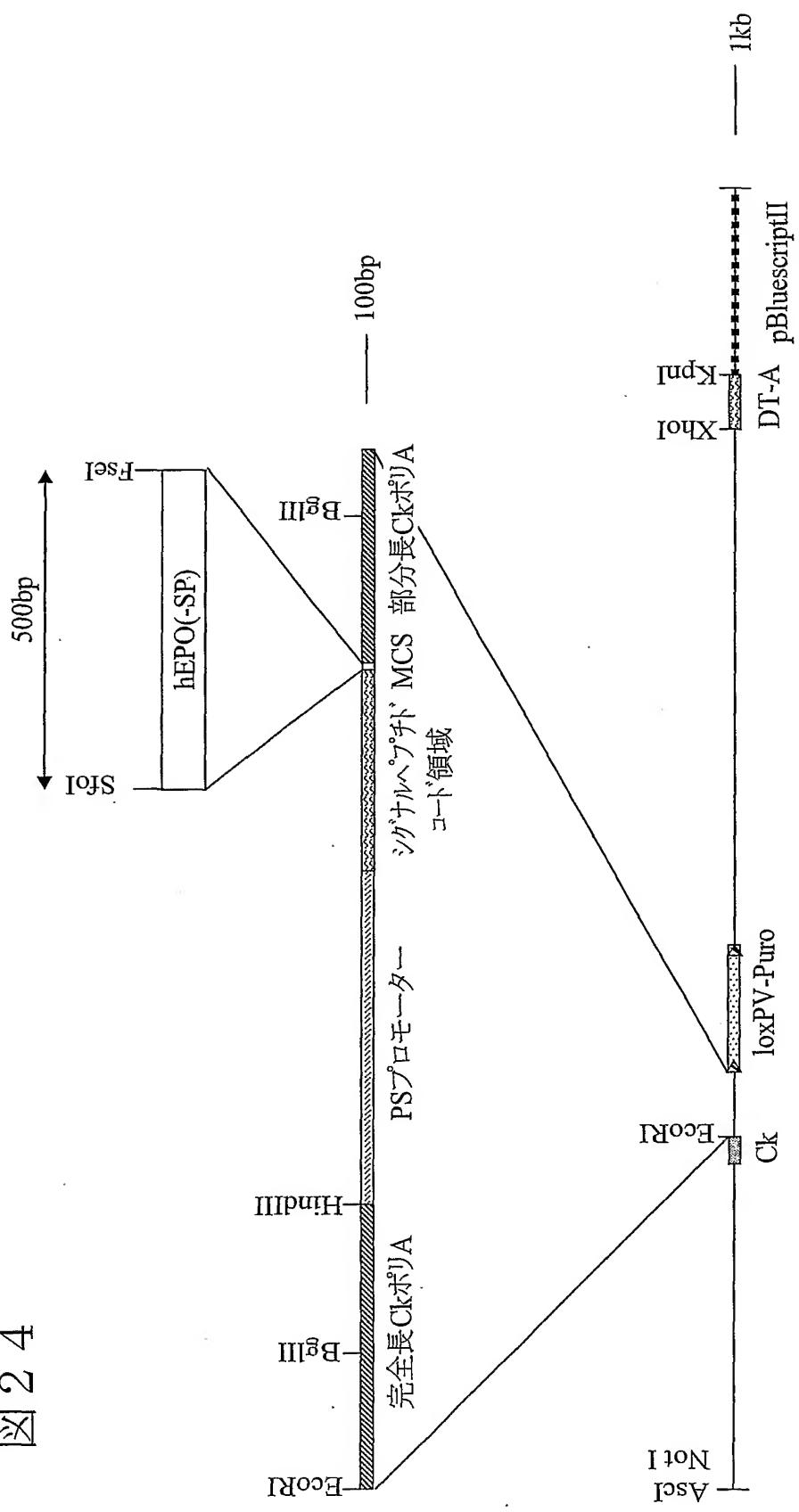
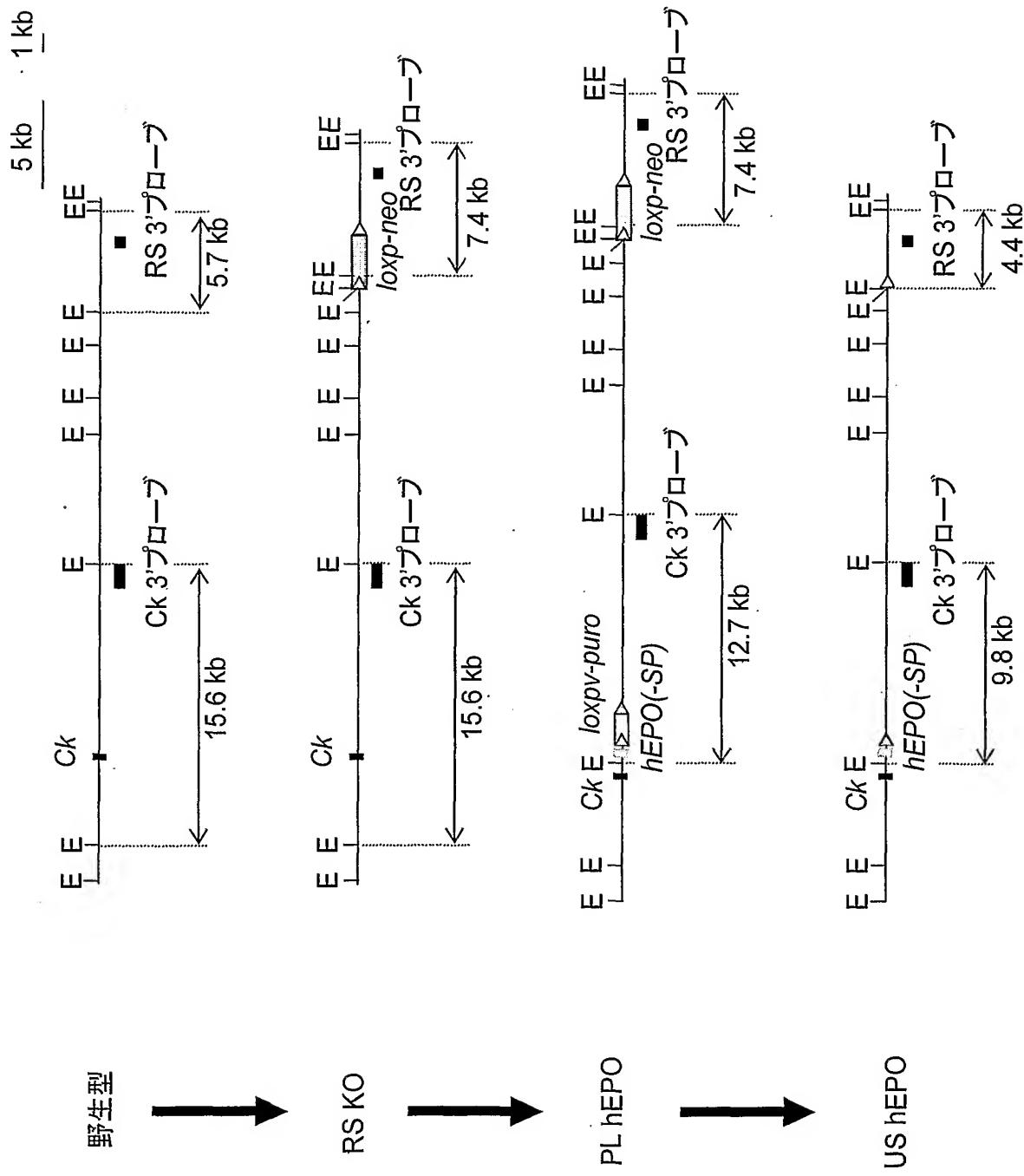


図25



## SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> Chimeric non-human animals and uses thereof

<130> PH-2709-PCT

<150> JP 2005-014826

<151> 2005-01-21

<160> 65

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

tcgacttaat taaggccggc ccttagctagc a

31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

agcttgctag ctagggccgg ccttaattaa g

31

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

ccttaattaa agttatgtgt cctagagggc tgcaaactca agatc

45

<210> 4

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

ttggccggcc ttggcgccag tggaacctgg aatgataaac acaaagatta ttg 53

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gggttaccag cttttgtgtt tgacccttcc cta 33

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ccgctcgaga gctaaaccta ctgtatggac aggg 34

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

cccaagctta gctcaaacca gcttaggcta caca

34

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

cgggatccct agaacgtgtc tgggccccat gaa

33

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

cagtcctggg cgcccccacca cgcct

25

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

ttggccggcc tcatctgtcc cctgtcctgc aggcc

35

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

ccttaattaa atatttcct ctttccta ccagtaacca ctctt

45

<210> 12

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

ttggccggcc ttggcgccctc tggacagtat gactagaaaa aagcaaaata gag

53

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

cgggatcccg gccaccatgg gggtgcacga atgtcctgcc t

41

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

ccgctcgagc gctatctgtc ccctgtcctg caggcc

36

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

ggccaggccc tggtggtaa ctcttc

26

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

cgcttgggg gaagcctcca agacc

25

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

tcgagtcgcg acaccggcgg gcgcgccc

28

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

tcgagggcgc gccccccgggt gtcgcgac

28

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

ggccgcttaa ttaaggccgg ccgtcgacg

29

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

aattcgtcga cggccggcct taattaagc

29

<210> 21

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

ataagaatgc ggccgcaaag ctggtgggtt aagactatct cgtgaagtg 49

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

acgcgtcgac tcacaggttg gtccctctct gtgtgtggtt gctgt 45

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

ttggcgcgcc ctccctagga ctgcagttga gctcagattt ga 42

<210> 24

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

ccgctcgagt cttactgtct cagcaacaat aatataaaaca gggg

44

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 25

catacaaaca gatacacacaca tatac

25

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26

gtcattaaatg gaaggaagct ctctca

25

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

tcttactaga gttctcacta gctct

25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28

ggaaccaaag aatgaggaag ctgtt

25

<210> 29

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 29

atctcgagga accactttcc tgaggacaca gtgatagg

38

<210> 30

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 30

atgaattcct aacactcatt cctgttgaag ctcttgac

38

<210> 31

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 31

atgaattcag acaaagggtcc tgagacgc

cc 32

<210> 32

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 32

atggatcctc gagtcgactg gatttcaggg caactaaaca tt

42

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 33

atgaattcgc ccctctccct cccccccccc ta 32

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 34

atgaattcgt cgacttgtgg caagcttatac atcgtgtt 38

<210> 35

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 35

agtcgaca 8

<210> 36

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 36

aatttgcgtca ctgc

14

<210> 37

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 37

cccaagcttt ggtgattatt cagagtagtt ttagatgagt gcat

44

<210> 38

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 38

acgcgtcgac tttgtctttg aactttggtc cctagctaat tacta 45

<210> 39

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39

acgcgtcgac gcggccggcc gcgcctagcag acaaagggtcc tgagacgcca ccaccagctc 60  
ccc 63

<210> 40

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 40

gaagatctca agtgcaaaga ctcactttat tgaatatttt ctg

43

<210> 41

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 41

ggaattcaga caaagggtcct gagacgccac caccagctcc cc

42

<210> 42

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 42

cccaagcttgcctcctcaaa cctaccatgg cccagagaaa taag

44

<210> 43

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 43

ataagaatgc ggccgcctca gagcaaatgg gttctacagg cctaacaacc t 51

<210> 44

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 44

cggaaattcc taacactcat tcctgttgaa gctcttgaca atgg 44

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 45

ccgctcgagc ggccaccatg ggggtgcacg aatgtcctg 39

<210> 46

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 46

ccgctcgagc ggtcatctgt cccctgtcct gca 33

<210> 47

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 47

ggccaggcgc gccttgc 17

<210> 48

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 48

ggccgcaagg cgcgccct 17

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 49

taaggcctag ctagggccgg 20

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 50

cccttagctag cccttaat

18

<210> 51

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 51

tcgagttAAC

10

<210> 52

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 52

agctgttaac

10

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linkerr

&lt;400&gt; 53

agctgtcgac ttaattaagg ccggccg

27

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linker

&lt;400&gt; 54

ctagcgccg gccttaatta agtcgac

27

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 55

ggccaggccc tgggttcaa ctcttc

26

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 56

cgcttgtggg gaagcctcca agacc

25

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 57

caccatggag aaggccgggg cccac

25

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 58

atcatacttg gcaggtttct ccagg

25

<210> 59

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 59

tcgataactt cgtataaagt atcctatacg aagttataga tctataactt cgtataaagt 60

atcctatacg aagttatgtt taaacgttaa cg 92

<210> 60

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 60

tcgacgttaa cgtttaaaca taacttcgta taggataactt tatacgaagt tatagatcta 60

taacttcgta taggataactt tatacgaagt ta 92

<210> 61

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 61

ggccaggccc tgttggtcaa ctcttc 26

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 62

cgcttgtggg gaaggctcca agacc 25

<210> 63

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 63

caccatggag aaggccgggg cccac 25

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 64

atcatacttg gcaggttctt ccagg

25

<210> 65

<211> 39

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 65

agtttctgca cgggcagtca gtttagcagca ctcactgtg

39

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

 International application No.  
 PCT/JP2006/301379

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

**C12N5/10** (2006.01), **A01K67/027** (2006.01), **C12P21/02** (2006.01), **C12N15/13** (2006.01),  
**C12N15/16** (2006.01), **C12N15/62** (2006.01), **C12N15/67** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12N5/110**, **A01K67/027**, **C12P21/02**, **C12N15/00-15/90**, **C07K14/405**, **C07K16/00-16/46**,  
**C07K19/00**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Medline (STN), JSTPlus (JDreamII),  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y	KITAMOTO T. et al., Humanized prion protein knock-in by Cre-induced site-specific recombination in the mouse., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1996, Vol. 222, pages 742-747	1, 4-6, 8-20/ 2, 3, 7
Y	ZOU Y-R et al., Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies., Curr. Biol., 1994, Vol. 4, No. 12, pages 1099-1103	2, 3, 7
Y/ A	WO 03/041495 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 22 May, 2003 (22.05.03), & EP 1452093 A1 & US 2005-17884 A1	2, 3, 7/ 1, 4-6, 8-20

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

 See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search  
 17 April, 2006 (17.04.06)

 Date of mailing of the international search report  
 25 April, 2006 (25.04.06)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/301379

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y/ P, A	JP 2006-94849 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 13 April, 2006 (13.04.06), (Family: none)	2,3,7/ 1,4-6,8-20
A	WO 00/10383 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 02 March, 2000 (02.03.00), & EP 1106061 A1 & JP 3732407 B2 & AU 5304299 A (examples 48, 76; Figs. 23, 30, 31)	1-20
A	KITAMOTO T. et al., Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions., Biochem.Biophys. Res.Commun., 2002, Vol. 294, pages 280-286	1-20

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10(2006.01), A01K67/027(2006.01), C12P21/02(2006.01), C12N15/13(2006.01),  
C12N15/16(2006.01), C12N15/62(2006.01), C12N15/67(2006.01)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10, A01K67/027, C12P21/02, C12N15/00 - 15/90, C07K14/405, C07K16/00 - 16/46, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Medline (STN), JSTPlus (JDreamII),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ Y	KITAMOTO T et al., Humanized prion protein knock-in by Cre-induced site-specific recombination in the mouse., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1996, Vol. 222, p. 742-747.	1, 4-6, 8-20/ 2, 3, 7
Y	ZOU Y-R et al., Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies., Curr. Biol., 1994, Vol. 4, No. 12, p. 1099-1103.	2, 3, 7

※ C欄の続きにも文献が列挙されている。

※ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.04.2006

国際調査報告の発送日

25.04.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4B 3537

田村 明照

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y/ A	WO 03/041495 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2003. 05. 22 & EP 1452093 A1 & US 2005-177884 A1	2, 3, 7/ 1, 4-6, 8-20
P Y/ P A	JP 2006-94849 A (麒麟麦酒株式会社) 2006. 04. 13 (ファミリーなし)	2, 3, 7/ 1, 4-6, 8-20
A	WO 00/10383 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2000. 03. 02 & EP 1106061 A1 & JP 3732407 B2 & AU 5304299 A (実施例 48, 76, 図 23, 30, 31)	1-20
A	KITAMOTO T et al., Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, Vol. 294, p. 280-286.	1-20